



TITLE:

大腸菌ミニFプラスミドの複製開始  
因子RepEの機能と構造(  
Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

石合, 正道

---

CITATION:

石合, 正道. 大腸菌ミニFプラスミドの複製開始因子RepEの機能と構造.  
京都大学, 1994, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1994-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3075832>

RIGHT:



新 制
理
861
京大附図

---

学 位 申 請 論 文

---

---

石合正道

---



大腸菌ミニFプラスミドの複製開始因子  
RepE の機能と構造

生物物理学専攻

石合正道

## 要旨

大腸菌のミニFプラスミドは、大腸菌染色体あたり厳密に1-2コピーに保たれ、複製制御機構を解明するモデル系としてこれまで多くの知見を与えてきた。ミニFプラスミドの複製開始制御にはミニFの *repE* 遺伝子にコードされる複製開始因子 (RepE) が中心的な役割をしている。さらに、大腸菌染色体複製に必要な DnaA、DnaB、DnaC、Hu などの因子に加え、DnaK、DnaJ、GrpE 熱ショック蛋白質が必要である。RepE は、複製開始領域 (*ori2*) から複製を開始させるイニシエーターと、*repE* 遺伝子の転写を自己抑制するリプレッサーとしての主要な2つの機能をもつ。しかし、この異なる機能がどのような機構で発揮されるのか明らかではなかった。

本研究では、ミニFプラスミド複製における熱ショック蛋白質の作用機構を解析する目的で、はじめに *dnaJ* 変異株で複製可能な変異ミニFを多数分離し、解析した。変異ミニFの多くは *repE* 遺伝子内に塩基置換があり、しかもほとんどが RepE の中央領域に集中していた。調べた変異はすべて、大腸菌 *dnaJ* 変異株だけでなく *dnaK*、*grpE* 変異株でも複製できた。これらの解析から、ミニFプラスミド複製において熱ショック蛋白質は協調的に働いており、おそらく RepE の活性化に関与することなどが示唆された。また、これらの変異をもつ RepE のすべては、イニシエーター活性が上昇し、多くはリプレッサー活性が減少していた。中でも RepE54 は、非常に興味深いことに、*in vivo* で RepE のイニシエーター活性が著しく上昇し、逆にリプレッサー活性をほとんど失っていた。このことは、RepE の2つの機能が分離できることを示している。

次に、RepE の2つの機能がどのような RepE の構造に対応するのかを明らかにするため、本研究ではさらに生化学的な解析を行った。精製した RepE54 は単量体、野生型 RepE は二量体として安定であった。ゲルシフト法で DNA への結合活性を調べたところ、*in vivo* の結果と一致して、RepE54 は *ori2* DNA に非常に効率良く結合

したが、オペレーター DNA にはほとんど結合しなかった。また、野生型 RepE を蛋白質変性剤で処理すると、*ori2* への結合が上昇し、同時にオペレーターへの結合が減少した。この条件で、野生型 RepE は部分的に単量体に変換しており、さらに、*ori2* への結合活性は単量体にのみ検出された。従って、RepE の単量体は *ori2* へ結合し、二量体はオペレーターへ結合すると結論され、各々が RepE のイニシエーター、リプレッサー活性に対応すると考えられる。

本研究の解析結果から、ミニFプラスミド複製制御における RepE の機能と構造について次のような作業仮説がたてられた。RepE の大部分は二量体として存在し、オペレーターへ結合して自己遺伝子の転写抑制を行うリプレッサーとして機能する。RepE 二量体が単量体に変換されると、単量体は *ori2* へ結合し、複製を開始するイニシエーターとして機能する。DnaJ、DnaK、GrpE 熱ショック蛋白質は分子シャペロンとして RepE の二量体から単量体への変換に関与している可能性が高い。この結果は、ミニFプラスミド複製開始に RepE の構造変換（二量体→単量体）による機能変換という正の制御が重要であることを示している。

# 目次

第1章	序論	
第1節	レプリコン仮説	1
第2節	ミニFプラスミドDNA複製制御における複製開始領域の構造とRepEの機能	2
第3節	ミニFプラスミド複製における宿主因子の役割	5
第4節	ミニFプラスミド複製における熱ショック蛋白質の役割	6
第5節	本研究の目的	8
第2章	材料と方法	9
第3章	結果	
第1節	大腸菌熱ショック蛋白質 <i>dnaJ</i> 変異株で複製可能な変異ミニFプラスミドの分離と解析	19
第2節	RepE蛋白質の単量体、二量体による機能分担	31
第4章	考察	
第1節	ミニFプラスミド複製における熱ショック蛋白質の役割	43
第2節	RepE蛋白質の構造と機能	45
第3節	RepEの機能ドメイン	47
第4節	今後の問題点	48
	参考文献	50
	謝辞	59

# 第1章 序論

## 第1節 レプリコン仮説

DNA 複製の過程は開始、伸長、終結の3段階に大別することができる。これまで主に、大腸菌およびそれを宿主とするファージ、プラスミドを実験系として、その各段階の反応がかなり明らかにされてきた。特に、伸長過程に関しては、分子レベルではほぼ解明されたと考えてよい。大腸菌などの原核生物、酵母、ヒトなどの真核生物でも細胞周期に同調したDNA複製の制御機構が存在することが、数多く知られている（Kornberg and Baker, 1992 参照）。また、Fプラスミドも、大腸菌染色体とは異なるが、細胞周期の特定の時期に複製する（Keasling *et al.*, 1991; Koppes, 1992）。このような複製制御機構を理解するうえで、複製の開始段階における制御はきわめて重要と考えられる。

これを説明するモデルとしてはレプリコン仮説がある（Jacob *et al.*, 1963）。この仮説では、自己複製単位をレプリコンと名付け、複製開始に必要なトランスに働く複製開始因子（イニシエーター）と、イニシエーターが結合し複製開始にシスに働く領域（レプリケーター）の2つの機能単位を想定した（図1）。複製開始はイニシエーターによる正の制御を受け、イニシエーターの合成あるいは活性の制御により制御される。レプリコンとして、大腸菌、枯草菌などの原核生物の染色体、ファージ、プラスミド、真核細胞を宿主とする一部のウイルス（SV40 など）などがよく知られている。なかでもプラスミドはこの仮説を実証する系として、これまで多くの知見を提供してきた。特にFプラスミドは、宿主染色体あたり1-2コピーに保たれ、しかも安定に娘細胞に受け継がれていくため、複製制御機構を解明するための優れたモデル系として、重要な役割を果たしてきた。

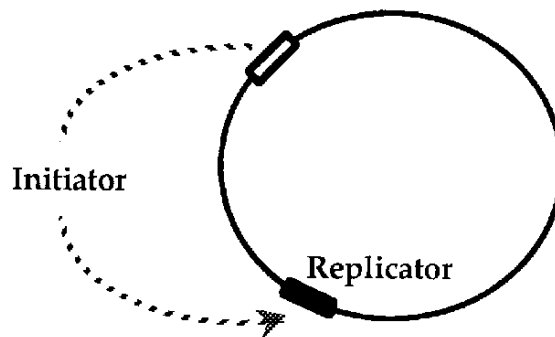


図1 レプリコン仮説のモデル

説明は本文を参照。文献 (Jacob *et al.*, 1963) より改変して転載。

## 第2節 ミニFプラスミドDNA複製制御における複製開始領域の構造と

### RepE の機能

大腸菌のミニFプラスミドは性決定因子 (F 因子) 由来である。F 因子ゲノム DNA (94.5 kb) を *Eco*RI 制限酵素により切断すると 19 個の断片に分けられ、そのうち f5 断片 (9.1 kb) に F の自律複製能があり、F 因子レプリコンの持つ DNA 複製 (*ori*、*rep*)、コピー数調節 (*incC*)、娘細胞への分配 (*sop*) などの機能が集約している (図2 A) (Kline, 1985 参照)。ミニFプラスミドの機能的な最小領域は、複製開始点 (*ori2*) と *repE* 遺伝子のみからなる 1.1 kb の断片で (Murotsu *et al.*, 1984)、我々は、これにアンピシリン耐性の *bla* 遺伝子を結合した最小ミニFプラスミド (pKV5110) を作成し、DNA 複製開始調節を解析している。このプラスミドは、コピー数を負に制御する *incC* 領域を欠失しているため、コピー数が上昇している (細胞当たり約 10 - 15 コピー) (Kawasaki *et al.*, 1991)。

*ori2* 領域 (217 bp) には、2 個の大腸菌染色体 DNA 複製のイニシエーター蛋白質 (DnaA) の結合部位 (DnaA Box : 5' - TTAT (A/C) CACA - 3')、AT 配列に富む領



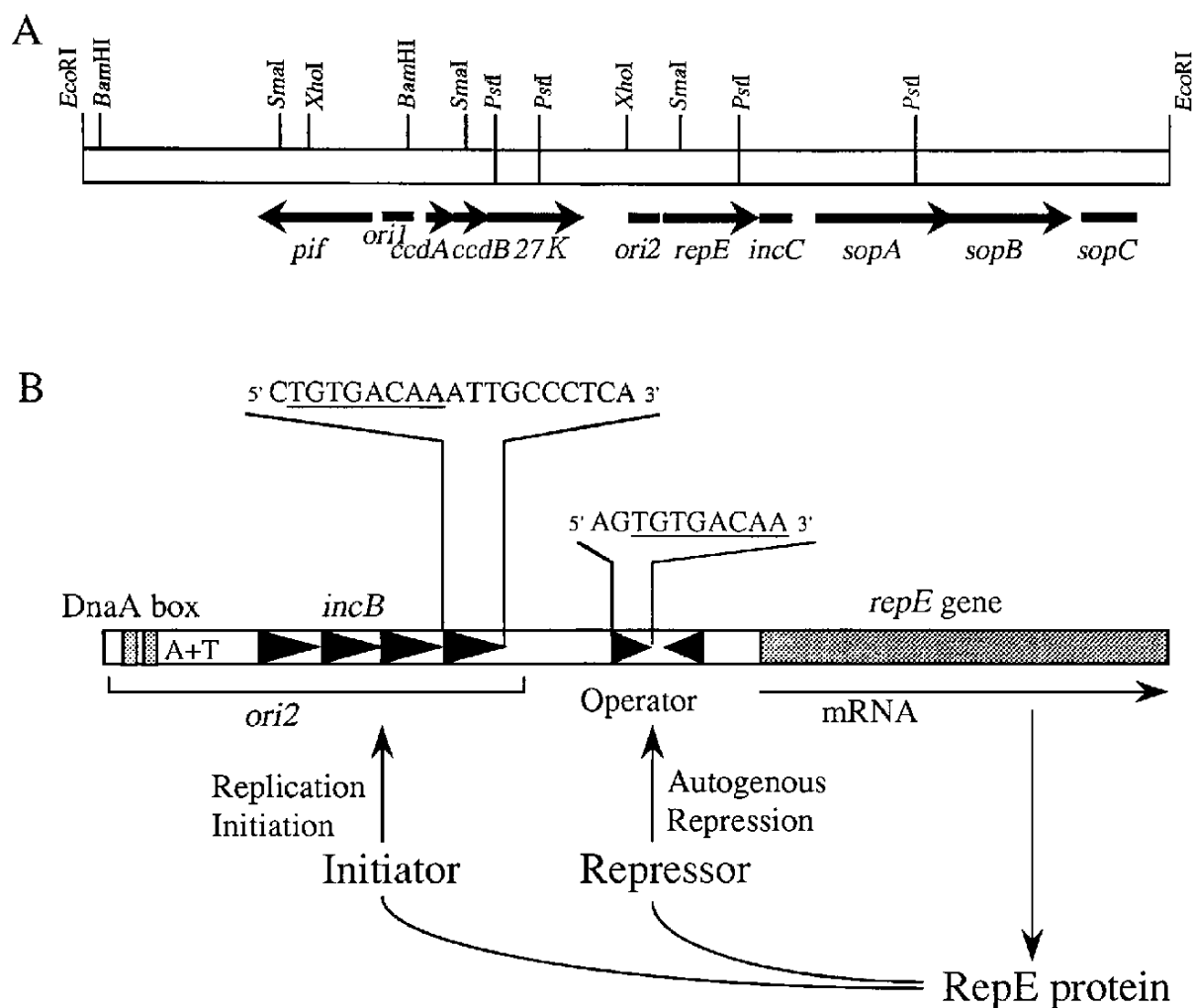


図2 F因子のf5断片とミニFプラスミドの複製制御の模式図

A. F因子のf5断片の制限酵素地図を上側に、既知の遺伝子または遺伝子産物（矢印）、領域（棒線）を下側に示した。説明は本文参照。

B. ミニFプラスミドの最小領域での複製制御の概略。RepE蛋白質が結合するイテロンとオペレーター部分で共通な塩基配列に下線を引いた。詳細な説明は本文参照。

域、4 個の 19 bp（イテロン）の反復配列からなる *incB* 領域などの特徴的な構造が見られる（図 2 B）（Kline, 1985 参照）。このような、*ori* の構造は大腸菌などの細菌の染色体（*oriC*）、P1、pSC101、R6K、RK2、Rts1 などのプラスミド、λ などのファージにも基本的に共通してみられ、複製開始のための基本的な構造と考えられる（図 3）（Bramhill and Kornberg, 1988）。

ミニ F プラスミドの *repE* 遺伝子産物（RepE 蛋白質）は、250 アミノ酸残基よりなる 29 kDa の塩基性蛋白質で、部位特異的な DNA 結合蛋白質である。RepE はミニ F プラスミド複製に中心的な役割をしており、*in vivo*、*in vitro* の両方で複製開始に必須であることが証明された（Watson *et al.*, 1982; Tolun and Helinski, 1982; Maki *et al.*, 1983; Muraiso *et al.*, 1987）。RepE は *ori2* からの複製を開始するイニシエーターと、自己遺伝子の転写抑制を行うリプレッサーとしての主要な 2 つの機能を持つ

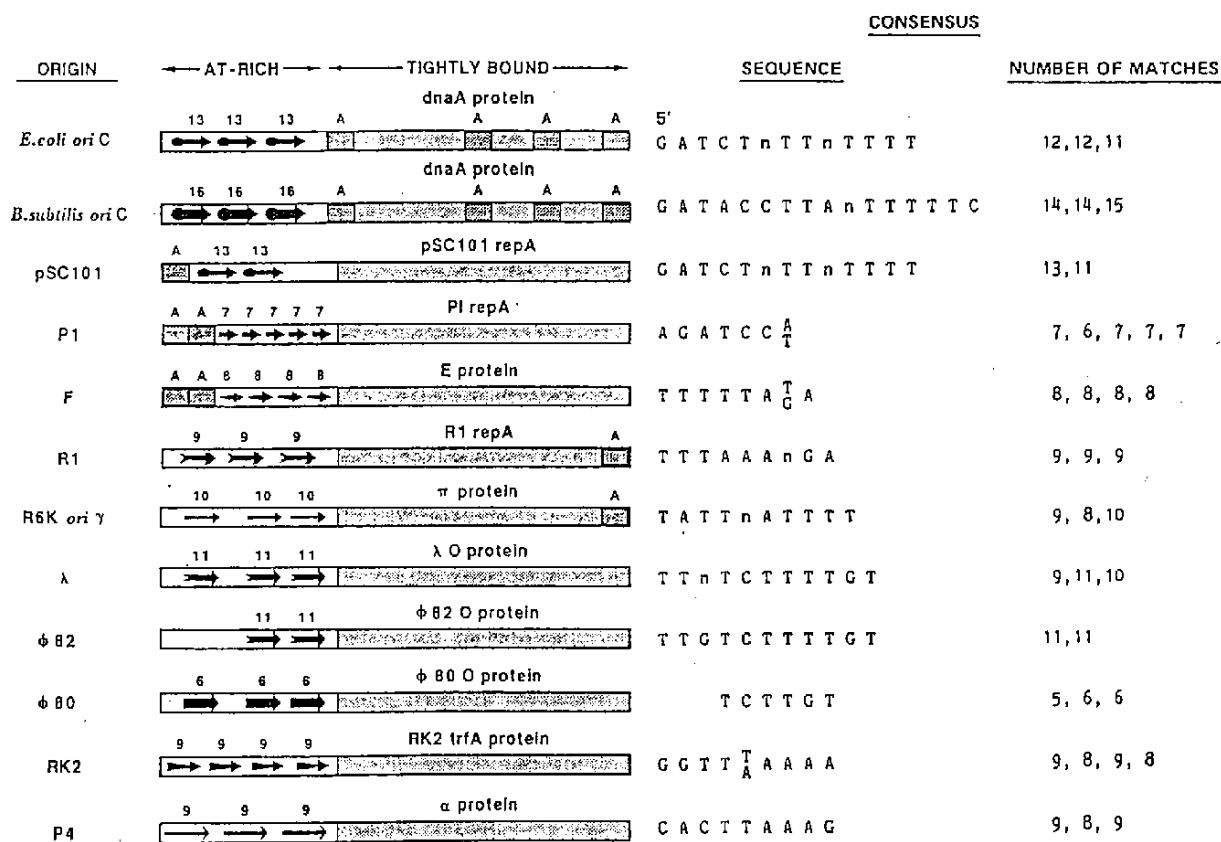


図 3 複製開始領域の構造の類似性

説明は本文参照。文献（Bramhill and Kornberg, 1988）より転載。

(Søgaard-Andersen *et al.*, 1984; Trawick and Kline, 1985)。これらの機能には、*ori2* 内の 4 個の 19 bp 配列 (イテロン)、*repE* 遺伝子のプロモーターの -10 領域にあるパリンδροーム配列 (オペレーター) に、それぞれ RepE が結合することが必須である (図 2 B 参照)。このイテロンとオペレーターには共通の 8 bp の配列があり (Murotsu *et al.*, 1981)、RepE はその配列に結合することが DNase I フットプリンティング実験により明らかにされた (Tokino *et al.*, 1986; Masson and Ray, 1986)。RepE は *ori2* の 19 bp 配列と相同な配列が 5 個存在する *incC* 領域にも結合する (Tokino *et al.*, 1986; Masson and Ray, 1986)。RepE は異なるいくつかの方法で精製されたが、いずれも二量体であった。この二量体が *ori2*、オペレーター領域に結合すると考えられてきたが、RepE の 2 つの機能がどのような RepE の構造に対応するのか未解決であった (Tokino *et al.*, 1986; Masson and Ray, 1986, 1988; Kline *et al.*, 1992; Kawasaki *et al.*, 1992)。

P1、pSC101、R6K、Rts1 などのプラスミドにおいても、それぞれミニ F プラスミドの RepE に相当する複製開始蛋白質 (イニシエーター蛋白質) が存在し、これらの蛋白質の発現もミニ F の RepE と同様に自己遺伝子の転写抑制により調節されている。また、これらのイニシエーター蛋白質も各々のプラスミドの複製開始領域 (*ori*) に結合することが知られている (Kornberg and Baker, 1992 参照)。しかし、これらの蛋白質の複製開始調節における作用機構の詳細についても、よくわかっていない。

### 第 3 節 ミニ F プラスミド複製における宿主因子の役割

ミニ F プラスミドの複製開始には、第 2 節で述べたプラスミド側の要素に加え、宿主大腸菌の因子にも依存する。なかでも大腸菌染色体の複製開始蛋白質 (DnaA) は、ミニ F プラスミド複製にも必須であり、前述のようにその結合部位 (DnaA box) はミニ F の *ori2* 領域にも存在する (Kline *et al.*, 1986; Hansen *et al.*, 1986; Murakami *et*

al., 1987)。このほか、DnaB、DnaC (Kornberg and Baker, 1992 参照)、ヒストン様蛋白質である Hu (Wada *et al.*, 1988) など、ミニ F 複製に必須である。

また、大腸菌 *rpoH* 変異株では、ミニ F プラスミド複製は阻害される (Wada *et al.*, 1986)。*rpoH* 遺伝子産物 ( $\sigma^{32}$ ) は、大腸菌の熱ショック応答に中心的な役割をしており、RNA ポリメラーゼのコア酵素と結合し、特異的に熱ショックプロモーターからの転写を引き起こす (Gross *et al.*, 1990 参照)。*rpoH* 変異株におけるミニ F 複製阻害機構の解析から、プラスミド上の *repE* 遺伝子の転写は主に  $\sigma^{32}$  RNA ポリメラーゼにより行われること (Wada *et al.*, 1987)、さらに、ミニ F プラスミドの複製開始に  $\sigma^{32}$  支配下にある大腸菌の熱ショック蛋白質 DnaK、DnaJ、GrpE が必須であることが明らかとなった (Ezaki *et al.*, 1989; Kawasaki *et al.*, 1990)。

#### 第 4 節 ミニ F プラスミド DNA 複製における熱ショック蛋白質の役割

*dnaK*、*dnaJ*、*grpE* は、もともと  $\lambda$  ファージ DNA 複製に関与する遺伝子として見つかった。 $\lambda$  ファージ DNA 複製系におけるこれらの蛋白質の役割は、複製開始領域 (*ori $\lambda$* ) において  $\lambda$  O 蛋白質、 $\lambda$  P 蛋白質、DnaB ヘリカーゼによる複製開始複合体 (preprimosomal complex) 形成を介添し、DnaK、DnaJ の ATP 加水分解を伴って DnaB ヘリカーゼを活性化することである。GrpE は、この反応中での DnaK の要求性を減少させる (Georgopoulos *et al.*, 1990 参照)。

ミニ P 1 プラスミド複製にも *in vivo*、*in vitro* の両方で、DnaJ、DnaK、GrpE が必須であることが示された (Tilly *et al.*, 1989; Bukau *et al.*, 1989; Wickner, 1990)。この系ではイニシエーター蛋白質 RepA 二量体がこれらの熱ショック蛋白質により単量体に変換され、RepA が活性化し、*ori* へ結合すると考えられている (Wickner *et al.*, 1991a, 1991b, 1992)。

大腸菌染色体複製における熱ショック蛋白質の関与としては、まず、高温で *oriC* からの DNA 複製開始阻害を示す *dnaK111* 変異株があげられる (Sakakibara, 1988)。

また、*in vitro* の *oriC* プラスミド複製系では、複製能が低い DnaA46、DnaA5 変異蛋白質の複製活性が DnaK、または GrpE により回復すること (Hwang and Kaguni, 1991; Hupp and Kaguni, 1993a)、アグリゲートし不活性化した野生型 DnaA が DnaK により活性化することが報告されている (Hwang *et al.*, 1990)。これらの熱ショック蛋白質による DnaA の活性化は、DNA 複製開始反応以前におこるが、詳細な分子機構は明らかにされていない (Hwang *et al.*, 1990; Hupp and Kaguni, 1993b)。

DnaK (HSP70 ホモログ)、DnaJ は生物種を通じよく保存され、GrpE も少なくとも酵母からそのホモログが見つかっており、これらは共同して細胞内のいろいろな反応に分子シャペロンとして機能することが知られている (Georgopoulos *et al.*, 1990; Gross *et al.*, 1990; Caplan *et al.*, 1993; Ikeda and Toh-e, 1993 参照)。

*dnaJ* 遺伝子は、大腸菌染色体 0.3 分に存在し、*dnaK* 遺伝子とオペロンを形成している。*dnaJ* 遺伝子を欠失させると大腸菌は 43 °C 以上で生育できなくなるため、高温での増殖に必須である (Sell *et al.*, 1990)。*dnaJ* 変異株は、非許容温度下で DNA、RNA 合成を阻害し、細胞周期や、細胞内の他の蛋白質の安定化に影響するなどの報告がある (Georgopoulos *et al.*, 1990 参照)。DnaJ (375 アミノ酸残基、分子量 41 kDa) は二量体の塩基性蛋白質で、おもに膜画分に存在し、一本鎖、二本鎖 DNA に非特異的に結合する (Zylicz *et al.*, 1985)。大腸菌の DnaK、DnaB、 $\lambda$  フェージの P 蛋白質と相互作用すること (Georgopoulos *et al.*, 1990 参照)、P1 プラスミド複製開始蛋白質 (RepA) と複合体を形成することも報告されている (Wickner, 1990)。従って、DnaJ は細胞内で多様な機能を持つと考えられるが、その詳細な分子機構はまだ明らかにされていない (Georgopoulos *et al.*, 1990; Gross *et al.*, 1990; Caplan *et al.*, 1993 参照)。



## 第5節 本研究の目的

我々は、ミニFプラスミド複製開始制御における熱ショック蛋白質の作用機構を詳細に解析する目的で、まず、遺伝学的解析により、*dnaJ* 変異株で複製できる変異ミニFを分離し、解析を始めた。この解析により、熱ショック蛋白質がミニFプラスミドの複製開始因子 RepE の活性化に作用している可能性が示唆された。また、RepE の主要な2つの機能（イニシエーター、リプレッサー）を区別できる *repE* 変異を分離することができた。これまで RepE の2つの機能がどのような RepE の構造と対応するのか明らかにされてなかったので、これらの変異 RepE を精製し、さらに生化学的な研究を行った。これらの結果を報告する。

## 第 2 章 材料と方法

### 2・1 大腸菌株

本研究で使用した菌株を表 1 に示す。BL21 は B 株、それ以外は全て K12 株である。遺伝学的解析の多くには MC4100 株、および熱ショック蛋白質遺伝子に変異を持つ誘導株を使用した。KY1453、KY1454、KY1455、KY1456 株はそれぞれ KY1457、DA16、CAG13350、CG992 株から *dnaJ259*、*grpE280*、*dnaK204*、*dnaJ::Tn10-42* 変異を MC4100 株に P1*vir* ファージを用いた普遍形質導入により移し、テトラサイクリン耐性と温度感受性で選択した。

### 2・2 プラスミド

本研究に使用したプラスミドを表 2 に示す。ミニ F プラスミドおよびその誘導プラスミドは図 4 A に、pKV7190 の構造と説明は図 6 A に示した。pKV531、pKV739 は *repE* 遺伝子 C 末端領域にフレームシフト変異 (*repE602*) を持つこと以外は、それぞれ pKV5110、pKV7190 と同一である (図 4 B)。pKV740 はミニ F プラスミドと pBR322 のコンポジットプラスミドで RepE の C 末端から 57 アミノ酸残基欠失した変異 RepE 蛋白質 (RepE $\Delta$ C57) を産生する。pBK815 は pET3b (Studier *et al.*, 1990) の T7 プロモーターの下流に野生型 *repE* 遺伝子をつないだプラスミドで、T7 RNA ポリメラーゼにより RepE の発現が著しく増大する (Kawasaki *et al.*, 1992)。解析に使用したミニ F 変異を持つプラスミドは、始めに分離した変異ミニ F の *Sma*I-*Eco*RV 断片 (635 bp) 又は、*Sty*I 断片 (647 bp) を野生型プラスミドの対応する断片と組み替えて作成した。ミニ F 変異を持つプラスミドは、すべてシーケンシングにより構造を確認した。

表1 使用した菌株

Strains	Relevant genotype	Reference
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD</i> $\Delta$ ( <i>argF-lac</i> ) <i>U169 rpsL relA flbB deoC ptsF rbsR</i>	Casadaban 1976
KY1453	MC4100 <i>dnaJ259 car-96::Tn10</i>	This work
KY1454	MC4100 <i>grpE280 pheA::Tn10</i>	This work
KY1455	MC4100 <i>dnaK204 thr::Tn10</i>	This work
KY1456	MC4100 <i>dnaJ::Tn10-42</i>	This work
KY1457	MT852 <i>car-96::Tn10</i>	This work
KY1603	MC4100 $\Delta$ <i>rpoH30::kan zfh-50::Tn10 suhX401</i> ( $\lambda$ pF13- <i>PrpoD-lacZ</i> )	Kusukawa and Yura 1988
NRK156	MC4100 <i>dnaK756 thr-34::Tn10</i>	Kawasaki <i>et al.</i> 1990
CAG13350	MC1061 <i>dnaK204 thr::Tn10</i>	Wild <i>et al.</i> 1992
CG992	B178 <i>dnaJ::Tn10-42</i>	Sell <i>et al.</i> 1990
DA16	DA15 <i>grpE280</i>	Ang <i>et al.</i> 1986
MT852	RB85T <i>dnaJ259 thr<sup>+</sup> thy<sup>+</sup></i>	Wada <i>et al.</i> 1982
KD1087	F <sup>-</sup> <i>mutD5</i> $\Delta$ ( <i>tonB-trpA, B</i> ) <i>leu argE his spcA</i>	Degnen and Cox 1974
MA194	AT2358 <i>mutT1</i>	Akiyama <i>et al.</i> 1987
BL21	F <sup>-</sup> <i>ompT</i>	Studier <i>et al.</i> 1990

表2 使用したプラスミド

Plasmids	Relevant genotype	Reference
pKV5110	<i>ori2 repE<sup>+</sup> bla</i>	Kawasaki <i>et al.</i> 1991
pKV531	pKV5110 <i>repE602</i>	This work
pKV711	pKV7090 <i>P<sub>trp</sub>-ΔrepE</i>	Kawasaki <i>et al.</i> 1991
pKV718	<i>ori2 bla</i>	Kawasaki <i>et al.</i> 1991
pKV7190	<i>ori</i> (pMB1) <i>trpR cat P<sub>trp</sub>-repE<sup>+</sup></i>	Kawasaki <i>et al.</i> 1991
pKV739	pKV7190 <i>repE602</i>	This work
pKV740	pKV511 <i>ori</i> (pMB1) <i>repEΔC57</i>	This work
pBK815	<i>ori</i> (pMB1) T7 promoter- <i>repE<sup>+</sup></i>	Kawasaki <i>et al.</i> 1992
pLysS	<i>ori</i> (p15A) <i>cat</i> phage T7 lysozyme	Studier <i>et al.</i> 1990
pACYC184	<i>ori</i> (p15A) <i>cat</i>	Chang and Cohen 1978

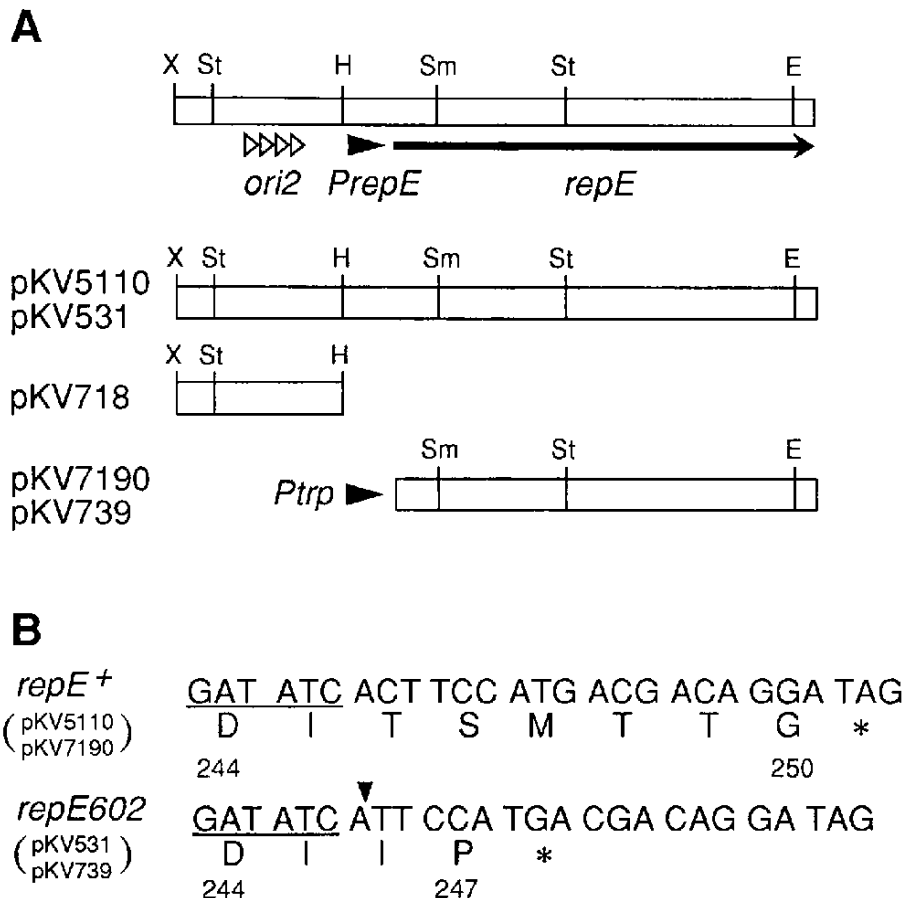


図4 ミニFプラスミドおよびミニF由来の断片を持つプラスミドの物理地図

A. ミニFプラスミドの *ori2*、*repE* 遺伝子領域を最上段に示した。黒の矢じりはプロモーターを、白の矢じりは 19 bp の配列（イテロン）を示す。pKV5110、pKV531、pKV718 はここに示した DNA 断片以外に、アンピシリン耐性の *bla* 遺伝子を持つ。pKV7190、pKV739 は pBR322 由来で *trp* プロモーターの下流に *repE* 遺伝子がつながっている。X, *Xho*I; St, *Sty*I; H, *Hin*fI; Sm, *Sma*I; E, *Eco*RV 制限酵素サイトを示す。

B. 野生型及び *repE602* フレームシフト変異の *repE* 遺伝子の C 末端部分の塩基配列及び推定されるアミノ酸残基配列。矢じりは、*repE602* 変異の 1 塩基の欠失部分を示す。*Eco*RV 制限酵素サイトを下線で示した。



## 2・3 培地

L 培地 -- 1 % バクトトリプトン、0.5 % イーストエキストラクト、0.5 % NaCl、1 M NaOH により、pH 7.4 に調製した。

ME 培地 -- 0.02 %  $\text{MgSO}_4$ 、0.2 % クエン酸、1.0 %  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.35 %  $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$ 。

本研究では 2  $\mu\text{g/ml}$  ビタミン $\text{B}_1$ 、0.5 % グルコース、0.5 % カザミノ酸、さらに必要に応じ L-トリプトファンを加えた。

MA 培地 -- 1.0%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.45%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.05% クエン酸、1 mM  $\text{MgSO}_4$ 。本研究では 1  $\mu\text{g/ml}$  ビタミン $\text{B}_1$ 、1  $\mu\text{g/ml}$  ビオチン、0.2 % グルコースを加えた。

培地には、必要に応じ 50  $\mu\text{g/ml}$  のアンピシリン、20  $\mu\text{g/ml}$  のクロラムフェニコール、12.5  $\mu\text{g/ml}$  のテトラサイクリンを添加した。栄養要求性の菌株には、20  $\mu\text{g/ml}$  のチミン、ウラシル、50  $\mu\text{g/ml}$  の L- アミノ酸を必要に応じて加えた。寒天培地には、1.2 % の寒天を含む。

## 2・4 形質転換、P1 普遍形質導入

形質転換は Hanahan の方法により行った (Hanahan, 1983)。P1 普遍形質導入は P1vir ファージを用い、Silhavy の方法に従った (Silhavy *et al.*, 1984)。

## 2・5 遺伝子組換えに関連する実験技術

プラスミド DNA の調製、制限酵素反応、DNA 断片間の結合、DNA 末端のリン酸化、脱リン酸化、電気泳動、ゲルからの DNA 断片の回収などは標準的な方法によった (Sambrook *et al.*, 1989)。DNA の合成には、Applied Biosystem 社のモデル 380B を使用し、方法は説明書を参考にした。PCR による DNA の増幅は、Perkin Elmer Cetus 社の自動増幅装置を用い、Gene Amp DNA Amplification Kit (Perkin Elmer Cetus 社) を使用した。方法は説明書に従った。DNA の塩基配列の決定には、

Sequenase DNA sequencing Kit (USB 社) を使用し、方法は説明書によった。PCR 法により増幅した DNA やプラスミド DNA を鋳型として用いた。

## 2・6 プラスミド DNA の突然変異誘発

突然変異が高頻度におこるミューテーター遺伝子を持つ KD1087 株 (*mutD5*) または、MA194 株 (*mutT1*) でミニ F プラスミド (pKV531) を複製させ、変異を導入した。この条件で、大腸菌染色体上の遺伝子の突然変異率 (具体的には、*gyrB* 遺伝子の変異によるナリジキシン酸耐性菌の出現頻度) を調べた結果、野生型の親株に比べ、*mutD5* 株で約  $1 \times 10^6$  倍、*mutT1* 株で約  $1 \times 10^3$  倍の突然変異率の上昇がみられ、これらの株で複製させたミニ F も高頻度で変異を持つことが期待される。独立な変異であることを確実にするため、形質転換体をそれぞれ別々に約 20 世代培養したものからプラスミド DNA を調製した。

これとは別に、ミニ F プラスミド (pKV531) を 37 °C、0.4 M ヒドロキシルアミンで 26 時間反応させ、突然変異を導入した。この処理では、確率的にプラスミド DNA あたり 1 個の点突然変異がおこることが期待される (Hashimoto and Sekiguchi, 1976)。

## 2・7 大腸菌 *dnaJ259* 変異株で複製可能な変異ミニ F プラスミドの分離

大腸菌 *dnaJ259* 変異株を野生型ミニ F プラスミド (pKV5110) で形質転換し、30 °C でアンピシリン耐性で選択すると、多くの不安定な疑似形質転換体が観察される。これは、変異ミニ F プラスミドを分離するためには大変不都合な問題であったが、*repE* 遺伝子の C 末端にフレームシフト変異 (*repE602*) を持つミニ F (pKV531) を使うことで解消できた。このプラスミドは、大腸菌野生株において正常に複製でき (コピー数は 8 - 10 で pKV5110 よりわずかに少ない)、かつ、*dnaJ259* 変異株で全く複製できず、疑似形質転換体は全くみられないため (Ishiai *et al.*, 1992)、pKV531 を親プラスミドとして用いた。

2・6で述べた方法で突然変異を誘発した pKV531 DNA を MT852 株 (*dnaJ259*) に導入し、30℃ でアンピシリン耐性の形質転換体を分離した。得られた形質転換体からプラスミド DNA を調製し、高頻度で、MT852 株を形質転換できるものをさらに解析した。内訳は、*mutD5* 株処理から 32 個、*mutT1* 株処理から 2 個、ヒドロキシルアミン処理から 15 個、合計 49 個である。

## 2・8 リプレッサー活性

MC4100 ( $\lambda$ -*PrepE-lacZ*) 株と pKV7190 (又はその誘導プラスミド) を使用した。プラスミド上の *trp* プロモーターから野生型または変異 RepE が発現し、その量は培地中の L-トリプトファン濃度により制御できる。培地中のトリプトファン濃度が上昇するにつれて、発現する RepE 量は減少する (図 6 参照)。これらの細胞内では、トランスに供給された RepE が  $\lambda$  プロファージ上の *repE* オペレーターに結合し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ (*lacZ* 遺伝子産物) の発現を抑制する。従って、 $\beta$ -ガラクトシダーゼの活性を測定することにより、見かけ上の RepE のリプレッサー活性を知ることができる (図 7 A 参照)。それぞれの菌をクロラムフェニコール、0、5、10 または、50  $\mu\text{g/ml}$  の L-トリプトファンを含む ME 培地を用いて 30℃ で  $3 \times 10^8$  細胞/ml まで培養し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定を行った (Kawasaki *et al.*, 1991)。

## 2・9 イニシエーター活性

MC4100 株と pKV7190 (又はその誘導プラスミド)、*ori2* プラスミド (pKV718) を使用した。*ori2* プラスミドの複製は、トランスに供給された RepE に完全に依存するので、*ori2* プラスミドのコピー数は RepE の見かけ上のイニシエーター活性を反映している (図 8 A 参照)。それぞれの菌をアンピシリン、クロラムフェニコール、50  $\mu\text{g/ml}$  の L-トリプトファンを含む ME 培地を用いて 30℃ で培養し、プラスミド DNA を調製し、*EcoRI* で処理した後、アガロースゲル電気泳動した。DNA バ

ンドをデンシトメーターで走査し、コピー数は pKV718 と pKV7190 の比で表した (Kawasaki *et al.*, 1991)。

## 2. 1 0 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の測定

文献 (Miller, 1972) によった。30 °C で対数増殖期の培養液 (クレットユニット 50) を採取した後、緩衝液を加えて細胞を破碎し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼによる ONPG の分解に伴う発色を分光光度計 (Beckman 社 DU-64) で測定した。

## 2. 1 1 イムノブロッティング

サンプルを SDS-PAGE 後、GV フィルター (Millipore 社) にブロッティングし、ウサギ由来の抗 RepE 一次抗体、抗ウサギ二次抗体 (Amersham 社)、horseradish peroxidase (Amersham 社) と順次かけていき、コニカ イムノステイン HPR (コニカ 社) 又は、ECL Western blotting detection reagents (Amersham 社) を用い検出した (Kawasaki *et al.*, 1991)。

## 2. 1 2 RepE の精製

野生型及び RepE54 を除く変異 RepE の精製法は基本的に文献の記載に従い (Kline *et al.*, 1992; Kawasaki *et al.*, 1992)、RepE54 の精製はいくつかの変更をした。pLysS と pBK815 (又は pBK815 に *repE* 変異を導入した誘導プラスミド) を持つ BL21 ( $\lambda$ DE3) 株をアンピシリン、クロラムフェニコールを含む L 培地を用いて、37 °C で 600 nm の吸光度が 0.4 になるまで培養し、IPTG を 0.5 mM 加え、3 時間さらに培養した (IPTG により T7 RNA ポリメラーゼが発現し、最終的に RepE が大量発現される)。集菌後、Tris- 0.45 M KCl バッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5、0.1 mM EDTA、450 mM KCl、10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol、10 % glycerol) 中でソニケーションにより細胞を破碎し、30,000 x g で 15 分間遠心した。RepE54 を除く変異 RepE および野生型 RepE は沈殿画分にあり、これを 5 M 塩酸グアニジンで溶解した。

RepE54 は上清画分にあり、さらに 150,000 x g で 1 時間遠心し、その上清を DEAE-sephacel カラム (Pharmacia LKB 社) へかけ、非吸着画分を回収した。それぞれの RepE を MES- 0.3 M KCl バッファー (20 mM MES-KOH pH 6.0、0.1 mM EDTA、300 mM KCl、10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol、10 % glycerol) で透析し、FPLC 陽イオン交換カラム (Mono S HR 5/5; Pharmacia LKB 社)、FPLC サイズカラム (Superose 12 HR 10/30; Pharmacia LKB 社) にかけた。野生型及び RepE54 を除く変異 RepE はこの標品を解析に用いたが、RepE54 は Tris- 0.45 M KCl バッファーで透析し、FPLC 陰イオン交換カラム (Mono Q HR 5/5; Pharmacia LKB 社) でアイソクラクティクに展開し、さらに精製した。精製は 4 °C で行った。200 ml の培養液から約 1 mg の精製 RepE (純度 99 % 以上) を得た (図 9 A 参照)。

### 2・13 RepE の濃度の決定

日立 L-8500 アミノ酸分析機で濃度を測定した RepE 標品を対照として、精製 RepE のサンプルを同じゲル中で SDS-PAGE を行い、クマシーブルー (CBB) で染色後、ゲルをデンストメーターで走査し、濃度を測定した。

### 2・14 RepE の分子量の決定

低角レーザー光散乱法 (LALLS 法) と、沈降速度法の異なる 2 つの方法を用いた。LALLS 法を用いた RepE の分子量決定は、高木の方法に従い (Takagi, 1981)、東レ・リサーチセンターに依頼した。精製 RepE をサイズカラム (Superdex 75 HR 10/30; Pharmacia LKB 社) を使用してゲル濾過し、UV 計 (280 nm) (島津社 SPD-2A)、LALLS 計 (He-Ne レーザー; 633 nm) (Chromatix 社 KMX-6)、示差屈折計 (Waters 社 R401) で検出した。測定は、MES- 0.5 M KCl バッファーを使用し、23 °C で行った。RepE の屈折率濃度変化 ( $dn/dc$ ) を直接測定するかわりに、分子量既知の蛋白質で同じ測定を行った。理論的に、分子量は LALLS 計の出力と示差屈折率計の出力の比に比例する (Takagi, 1981)。



沈降速度法は、Beckman 社の分析用超遠心機 (Optima XL-A) を使用した (Olsen *et al.*, 1992)。分析用超遠心に用いたサンプルの濃度は 280 nm の吸光度で、野生型 RepE が 0.2、RepE54 が 0.4 であり、ゲルシフト法のバッファー (後述) から BSA、poly (dI-dC)、プローブ DNA を除いたものを使用した。実験条件は、ローター回転速度 50,000 rpm、1 時間、25 °C で 6 分毎に測定した。

## 2・15 RepE の DNA 結合活性の測定

ゲルシフト法によった (Kawasaki *et al.*, 1992)。プローブ DNA は、ミニ F プラスミドを *Stu*I、*Alu*I、*Sma*I で切断し、アガロースゲル電気泳動後、130 bp の *ori2* DNA 断片と 180 bp のオペレーター DNA 断片を回収し、Alkaline Phosphatase 処理後、T4 Polynucleotide Kinase を用い、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  で DNA の末端をラベルし、作成した (図 10 参照)。

反応液は、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、40 mM NaCl、40 mM KCl、10 mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.1 mg/ml BSA、10  $\mu\text{g/ml}$  poly (dI-dC) と  $[\text{P}^{32}]$  ラベルのプローブ DNA、RepE を含み、30 °C、30 分間静置した。10 % PAGE 後、ゲルを乾燥し、DNA バンドは Fujix Bioimaging Analyzer BAS2000 (富士フイルム社) を使って定量した。

## 2・16 $[\text{H}^3]\text{-RepE54}$ の調製

pLysS と pBK815 (*repE54*) を持つ BL21 ( $\lambda\text{DE3}$ ) 株をアンピシリン、クロラムフェニコール、各々 200  $\mu\text{g/ml}$  の 20 種の L-アミノ酸を含む 100 ml の MA 培地で 37 °C で培養し、 $\text{OD}_{600}=0.6$  で一度集菌し、Leu、Lys を除いた同じ培地に懸濁した。1.6 mCi  $[\text{H}^3]\text{-Leu}$  (1 mCi/ml)、1.6 mCi  $[\text{H}^3]\text{-Lys}$  (1 mCi/ml) と、0.5 mM IPTG を加え、3 時間さらに培養した。RepE54 の精製は 2・12 の記述に従ったが、Superose 12 の段階まで精製したものを実験に使用した。

## 第3章 結果

### 第1節 大腸菌熱ショック蛋白質 *dnaJ* 変異株で複製可能な変異ミニF

#### プラスミドの分離と解析

#### 3・1 大腸菌 *dnaJ* 変異株で複製可能な変異ミニF プラスミドの分離

ミニF プラスミドは大腸菌 *dnaJ*、*dnaK*、*grpE* のそれぞれの温度感受性変異株で 30 °C（許容温度；大腸菌の増殖は正常）でも複製することができない（Kawasaki *et al.*, 1990）。*dnaJ259* 変異株（MT852）で複製可能な 49 個の独立な変異ミニF プラスミドを分離した（2・7 参照）。まず、変異ミニF を適当な制限酵素を使って切断し、親プラスミドの pKV531 由来の制限酵素断片と入れ替え、*dnaJ259* 変異株で複製できる変異がどの断片に存在するかを調べた。30 個が RepE 蛋白質のコーディング領域内に対応する *SmaI-EcoRV* (635 bp) 断片内に、4 個が複製開始点 (*ori2*) から RepE 蛋白質の N 末端領域に相当する *StyI-SmaI* (407 bp) 断片内に変異をもつことがわかった。

次にこれら 34 個の変異の塩基配列上の変化を決定した（図 5）。RepE 蛋白質のコーディング領域内の *SmaI-EcoRV* 断片内にマップされた 30 個のうち 22 個は、Glu<sub>92</sub>（16 個）又は、Glu<sub>109</sub>（6 個）に置換がおこっていた。これらは、以前我々の研究室から  $\sigma^{32}$  欠失変異株 ( $\Delta rpoH$ ) で複製可能な変異ミニF として報告した *repE10* 変異、*repE26* 変異と全く同一の塩基置換である（Kawasaki *et al.*, 1991）。7 個の変異 (*repE18*、*repE40*、*repE54*、*repE105*) は、今までに報告のない 1 塩基置換で、いずれも RepE の中央の狭い領域 (92-134 残基) に局在し、*repE10*、*repE26* 変異の近傍に起こっていた。このうち 4 個は、同一の塩基置換 (*repE105*) であった。残りの 1 個 (*repE30* 変異) は、二重変異であり 99 番目と 100 番目の Glu 残基がともに Lys 残基に変化していた。興味深いことに、前者は *repE18* 変異と、後者は F



プラスミドのコピー数が上昇すると報告された *copA1* 変異と全く同一の塩基置換であった (Helsberg *et al.*, 1985)。 *copA1* 変異だけを pKV531 に導入した変異プラスミドも、*dnaJ259* 変異株で複製できたので、このプラスミドを *repE30* 二重変異のかわりにさらに解析した。 *StyI-SmaI* 断片内の 4 個の変異は同一で、 *repE* 遺伝子のプロモーター／オペレーターの -10 領域に 1 塩基置換 (*repEp110* 変異) をおこしており、以前 *repE* 遺伝子の自己転写抑制能が欠失すると報告された変異と同一であった (Rokeach *et al.*, 1985)。

### 3. 2 熱ショック関連変異株における変異ミニFプラスミドの複製能

*dnaJ259* 変異株で複製可能な変異ミニFプラスミドが大腸菌の他の熱ショック蛋白質変異株 (*dnaK*、*grpE*) や熱ショックシグマ因子  $\sigma^{32}$  の欠失変異株 ( $\Delta rpoH$ ) で、複製できるかどうかを調べた (表 3)。変異ミニFから親プラスミド由来の *repE602* 変異を分離したミニFプラスミドを構築し、これ以降の実験に用いたが、*repE40*、*repE54* 変異だけを持つ pKV5110 プラスミドは分離できず (後述)、*repE602* 変異との二重変異を用いた。

表 3 変異ミニFプラスミドの形質転換効率<sup>a</sup>

Strain	Mini-F plasmids carrying <i>repE</i> allele:									
	+	10	18	26	105	<i>copA1</i>	<i>p110</i>	602	40-602	54-602
MC4100 wild type	1.0	0.6	0.8	0.3	0.9	0.8	1.0	0.9	0.9	1.0
KY1453 <i>dnaJ259</i>	(0.1)	0.2	0.5	0.6	0.7	0.4	0.4	10 <sup>-5</sup>	0.6	0.4
KY1456 <i>dnaJ::Tn10</i>	(0.2)	0.5	0.5	0.4	0.9	0.6	0.8	10 <sup>-4</sup>	0.4	0.5
KY1455 <i>dnaK204</i>	10 <sup>-4</sup>	0.5	0.4	0.2	0.4	0.3	0.3	10 <sup>-4</sup>	0.3	1.0
NRK156 <i>dnaK756</i>	(0.1)	0.4	0.7	0.4	0.6	0.6	0.3	10 <sup>-5</sup>	0.8	1.1
KY1454 <i>grpE280</i>	(10 <sup>-2</sup> )	0.1	0.3	0.8	0.7	0.7	0.3	10 <sup>-4</sup>	0.3	0.6
KY1603 $\Delta rpoH30$	10 <sup>-3</sup>	0.3	10 <sup>-4</sup>	0.3	0.5	10 <sup>-2</sup>	0.1 <sup>b</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup>	0.8

a. pKV5110 (*repE*<sup>+</sup>) または各々の変異を持つ pKV5110 誘導プラスミドを使用した。形質転換は 30 °C で行い、pBR322 による形質転換効率との比で表し、大腸菌野生株 (MC4100) における野生型ミニF (pKV5110) の値を 1.0 とした時の相対値を示した。( ) 内は疑似形質転換体を示す。

b. 効率は低い小さなコロニーが観察され、これらの変異ミニFは  $\Delta rpoH$  で効率は悪いが複製できた。

宿主は温度感受性変異であるため、宿主菌の増殖に影響のない許容温度（30℃）で実験を行った。調べた全ての変異ミニFは *dnaK*、*grpE* 変異株でも複製可能であったが、親プラスミド [pKV531 (*repE602*)、pKV5110 (*repE*<sup>+</sup>)] は複製できなかった（表3）。このことは、ミニFの複製にも大腸菌の DnaK、DnaJ、GrpE 熱ショック蛋白質が協調的に働くことを示している。さらに、*dnaJ* 遺伝子に Tn10 を挿入した KY1454 株 ( $\Delta$ *dnaJ*) でも、これらの変異ミニFは複製可能なことから、これらは DnaJ 蛋白質の機能に全く依存しなくなったことが示唆される。

一方、 $\sigma^{32}$  の欠失変異株 ( $\Delta$ *rpoH*) では、以前報告した *repE10*、*repE26* 変異（Kawasaki *et al.*, 1991）に加え、*repE54-602*、*repE105* 変異は安定に複製できたが、*repEp110*、*copA1* 変異もわずかながら複製が観察された（表3）。*repE18*、*repE40-602* 変異ミニFは、 $\Delta$ *rpoH* 株でほとんど複製できなかった。後者の場合、*repE* 遺伝子の転写量、あるいは DnaK、DnaJ、GrpE 熱ショック蛋白質の産生量が減少し、おそらく複製に十分な量供給されないことが原因ではないかと想像される。

### 3・3 変異ミニFプラスミドのコピー数

プラスミド変異がミニF複製制御に及ぼす影響を調べるため、変異ミニFのコピー数を大腸菌野生株（MC4100）、*dnaJ259* 変異株（KY1453）で調べた。*pACYC184* プラスミドを持った大腸菌を用い、変異ミニFのコピー数は *pACYC184* との相対値で表した（表4）。*pACYC184* のコピー数は実験に用いた大腸菌変異による影響を受けない（Kawasaki *et al.*, 1991）。*repE10*、*repE26* 変異ミニFは野生株と同様、*dnaJ259* 変異株でも非常に高いコピー数を示した。*copA1* 変異プラスミドも同様で、特に *dnaJ259* 変異株で高いコピー数を示した。その他の変異ミニFは、*dnaJ* 変異株でのコピー数が野生株に比べ低い傾向がみられるが、これはおそらく *dnaJ* 変異の間接的な影響と思われる。一見矛盾するが、これらの高いコピー数を示す変異ミニFは、非常に不安定である。おそらく、コピー数が高すぎることにより、



宿主菌に強い増殖阻害がおこるためと考えられる (Kawasaki *et al.*, 1991 参照)。

一方、*repE105*、*repE18*、*repE40-602* 変異ミニFは野生株でわずかにコピー数の上昇がみられる。*repE54-602* 二重変異プラスミドは高いコピー数を示すが、これは主に変異 RepE の示す高いイニシエーター活性と、*repE* 遺伝子の自己転写抑制能を欠いたためであろう (後述)。*repE40*、*repE54* 変異を単独で持つ変異ミニFプラスミドを作ることはできなかった。*repE40*、*repE54* 変異は高いイニシエーター活性を持ったため (後述)、プラスミドのコピー数が高くなり過ぎて、宿主の増殖阻害を引き起こすと考えられる。

表4 変異ミニFプラスミドのコピー数および RepE 量<sup>a</sup>

Plasmid	Copy number in <sup>a</sup> :		RepE protein level in <sup>b</sup> :	
	MC4100 ( <i>dnaJ</i> <sup>+</sup> )	KY1453 ( <i>dnaJ259</i> )	MC4100 ( <i>dnaJ</i> <sup>+</sup> )	KY1453 ( <i>dnaJ259</i> )
<i>repE</i> <sup>+</sup>	1.0		1.0	
<i>repE10</i>	22 <sup>c</sup> (89)	10 <sup>c</sup> (25)		
<i>repE26</i>	19 <sup>c</sup> (60)	7.2 <sup>c</sup> (29)		
<i>copA1</i>	5.6	20 <sup>c</sup> (91)	1.6	1.0
<i>repE18</i>	1.2	0.8	1.0	0.7
<i>repE105</i>	1.9	1.0	2.7	1.4
<i>repEp110</i>	2.7	2.2	6.5	2.7
<i>repE602</i>	0.7		1.0	
<i>repE40-repE602</i>	1.8	0.8	1.9	1.0
<i>repE54-repE602</i>	22 <sup>c</sup> (90)	6.3 <sup>c</sup> (65)	4.1	3.0

a. ミニFプラスミドと pACYC184 を持つ菌をアンピシリン、クロラムフェニコールを含む L 培地で 1 晩培養した。プラスミド DNA を調製し、*EcoRI*、*BglII* 制限酵素で処理した後、アガロース電気泳動した。DNA のバンド濃度をデンストメーターで走査し、pACYC184 のバンドの濃度を対照にミニF DNA のバンド濃度を比較した。3 回の実験の平均値を示した。大腸菌野生株 (MC4100) における野生型ミニF (pKV5110) の値を 1.0 とした時の相対値を示す。 b. 各々の変異ミニFを持つ菌の対数増殖期の培養液に、対照として C 末端が短くなった RepE (RepEΔC57) を一定量加え、TCA 処理し、SDS PAGE 後、イムノプロットにより RepE 量を測定した。大腸菌野生株 (MC4100) における野生型ミニF (pKV5110) の値を 1.0 とした時の相対値を示す。 c. これらの場合は、プラスミドを持たない菌が高頻度で出現するため、( ) 内に示した培養液に見られるプラスミドを脱落した菌の出現頻度で補正した。実際のコピー数はここに示したものより高いと思われる (本文参照)。

最後に、*repE10*、*repE18*、*repE26* 変異ミニFについて *dnaK204*、*dnaK756*、*grpE280*、*ΔrpoH* 変異株でコピー数を調べたところ、上記の結果とほとんど変わらなかった（データー提示せず）。

### 3・4 細胞内の変異 RepE の量

野生株（MC4100）、*dnaJ259* 変異株（KY1453）での細胞内の RepE 量をイムノブロットイングにより調べた（ただし、*repE10*、*repE26* 変異はプラスミドが非常に不安定なため除外した）。表 4 に示したようにミニFのコピー数と RepE の発現量には相関性が見られた。コピー数の著しく上昇した変異ミニF（*copA1*、*repE54-602* 変異）の RepE 量は、変異ミニFが不安定であるため、明らかに少なく見積った値である。興味深いことに、野生株（MC4100）におけるプロモーター／オペレーター領域の変異ミニF（*repEp110* 変異）のコピー数は野生型ミニFに比べ 2.7 倍であるが、RepE 量は野生型ミニFの 6.5 倍と多い。この結果は、3・3 で見られた多くの変異ミニFが示す高いコピー数は、RepE の量が多いことだけではなく、高いコピー数に見合うような RepE の活性化がおこっていることを示唆している。

### 3・5 変異 RepE の リプレッサー活性

変異 RepE による *repE* 遺伝子の自己転写抑制（リプレッサー）活性を測定した（図 7 A、2・8 参照）。調べた変異のうち、RepE54 はほとんど完全に、RepE105 は著しくリプレッサー活性を失っていた（図 7 B）。RepE10、RepE26、RepE40 でも、野生型 RepE に比べ、少しではあるが明らかに活性は減少していた。一方、RepE18、CopA1 の示す活性は、野生型 RepE と比べ顕著な差は認められなかった。リプレッサー活性を測定した条件で細胞内に存在する RepE の量をイムノブロットイングで調べたところ、RepE105 以外は野生型 RepE の量とほとんど変わらなかった。RepE105 の量は、野生型の 50 % 程度にまで減少していたため、何らかの理由で RepE105 は細胞内で不安定になっていると考えられる。

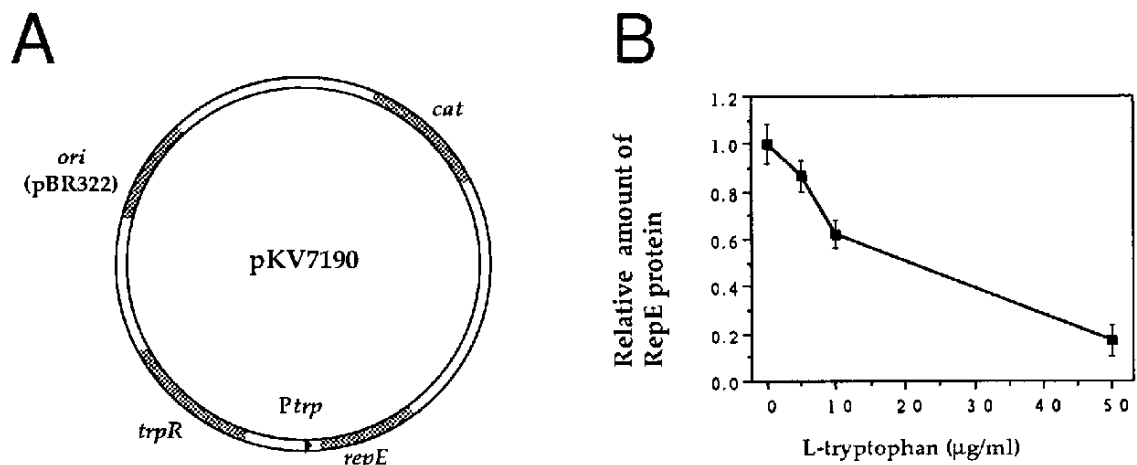
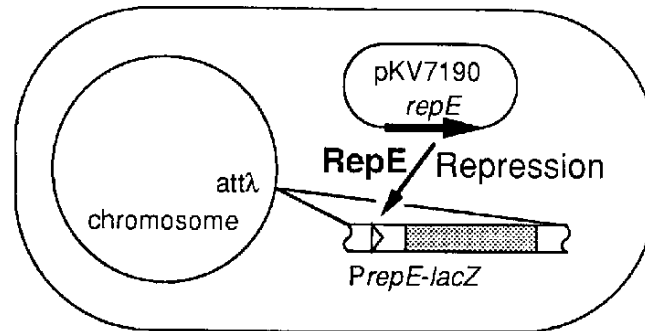


図6 pKV7190 の構造と、トリプトファン濃度による RepE の発現量

A. pKV7190 は pBR322 のレプリコンで、*trp* プロモーター／オペレーターの下流に *repE* 遺伝子を、さらに *trpR* 遺伝子をつなぎ作成した。培地中の L-トリプトファン濃度により RepE の発現を制御できる (Kawasaki *et al.*, 1991)。

B. 培地中の L-トリプトファン濃度による RepE の発現量。pKV7190 を持つ大腸菌野生株 (MC4100) をそれぞれの濃度のトリプトファンを含む ME 培地で 30 °C で培養し対数増殖期にサンプルをとり、イムノブロティンにより RepE 量を測定した。トリプトファン 0 µg/ml の値を 1.0 として相対値で表した。

## A Repressor Activity



## B

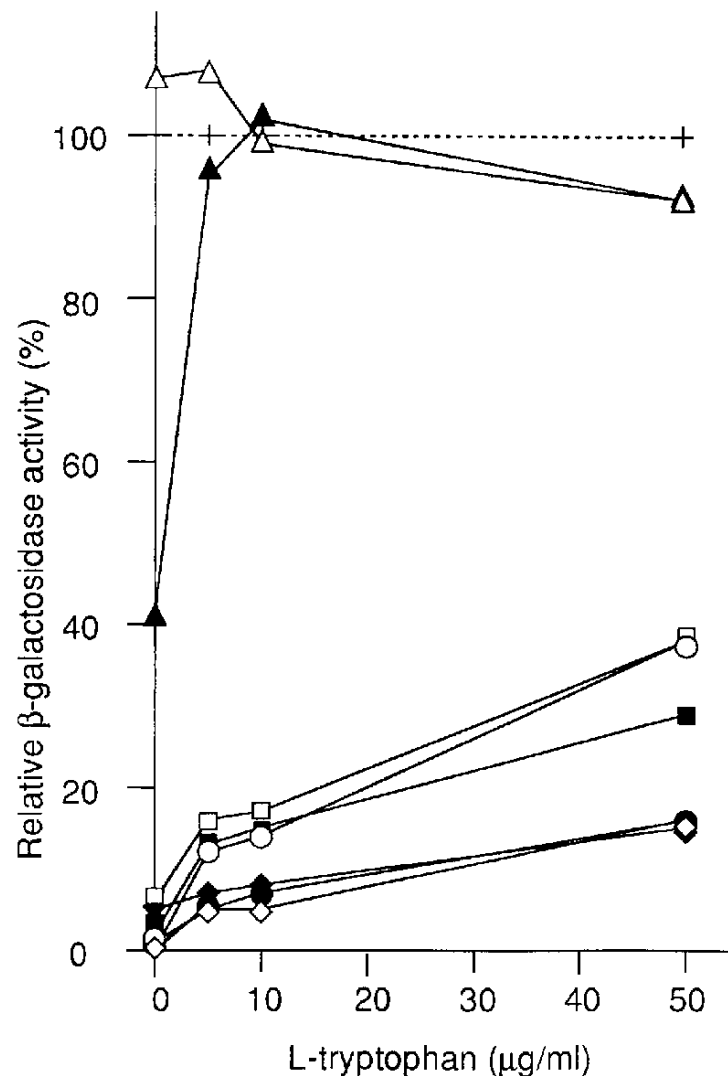


図7 RepE のリプレッサー活性の測定法と、変異 RepE のリプレッサー活性

A. RepE のリプレッサー活性は pKV7190 からトランスに供給された RepE による大腸菌染色体上の *repE* プロモーター下流にある *lacZ* 遺伝子の転写抑制活性を  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定することにより求めた。

B. pKV7190 (または *repE* 変異を持つその誘導プラスミド) を持つ MC4100

( $\lambda$ pF13-*PrepE-lacZ*) 株を 30 °C で培養し、対数増殖期に培養液を採取し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を測定した。*repE* 遺伝子を欠失した pKV711 ( $\Delta$ *repE*) プラスミドの活性を 100 として相対値で表した。+, no RepE; ◇, 野生型 RepE; ○, RepE10; ●, RepE18; □, RepE26; ■, RepE40; △, RepE54; ▲, RepE105; ◆ CopA1.

### 3・6 変異 Rep 蛋白質のイニシエーター活性

変異 RepE のイニシエーター活性は、2・9 に述べた方法により *ori2* プラスミド (pKV718) のコピー数を測定して求めた (図 8 A)。*ori2* プラスミドの複製はトランスに供給された変異 RepE の活性に定量的に依存する。調べた全ての変異 RepE は、野生型 RepE に比べイニシエーター活性の上昇が見られた (野生型の 2 - 6 倍) (図 8 B)。RepE10、RepE26、RepE40、RepE54、CopA1 は特に高いイニシエーター活性を示した。RepE18 はわずかに活性の上昇が見られた。

興味深いことに、RepE の C 末端の *repE602* 変異が共存すると RepE40、RepE54 の示す高いイニシエーター活性が抑制された (図 8 C)。この現象と対応して、*repE40-602*、*repE54-602* 変異を持つ RepE をトランスに供給するプラスミドをあらかじめ持たせた菌を *ori2* プラスミドで形質転換した場合、野生型 RepE を供給できる菌に比べ、形質転換効率が 1/10 ~ 1/100 に低下した (データ提示せず)。これに対し、*repE602* 変異が野生型、*repE40* 変異、*repE54* 変異と共存しても、リプレッサー活性にはほとんど影響しなかった (データ提示せず)。これらの結果は、RepE のイニシエーター活性に、RepE の中央領域 (92-117 残基領域) と C 末端領域との相互作用が特異的に重要である可能性を示唆する。

## A Initiator Activity

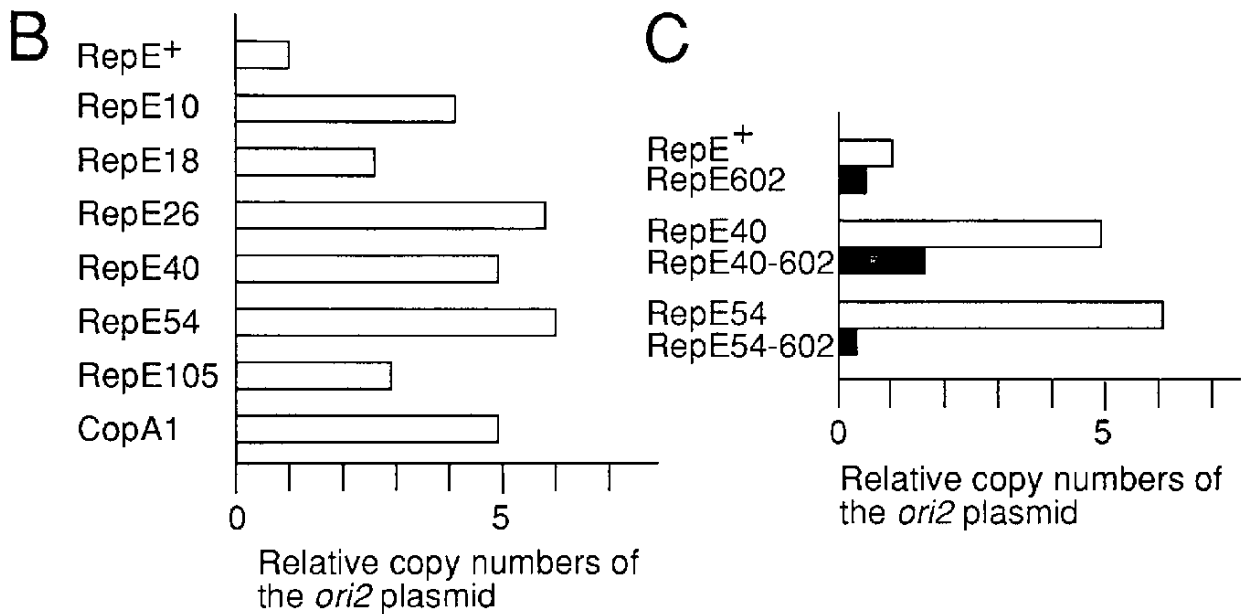
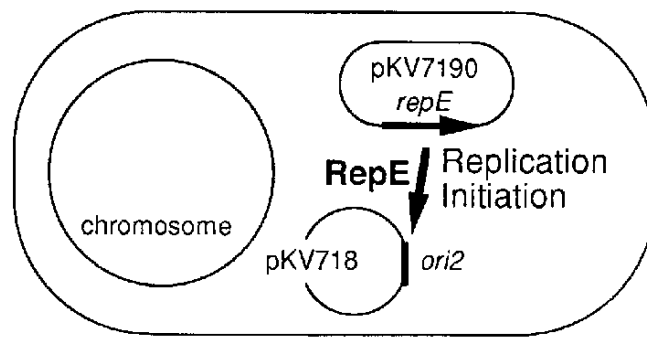


図8 RepE のイニシエーター活性の測定法と、変異 RepE のイニシエーター活性

- A. RepE のイニシエーター活性は *ori2* プラスミド (pKV718) のコピー数を測定して求めた。*ori2* プラスミドの複製はトランスに供給された RepE に依存する。
- B. 変異 RepE のイニシエーター活性。pKV718 と pKV7190 (または *repE* 変異を持つその誘導プラスミド) を持つ MC4100 株を 30℃ で培養し、対数増殖期に培養液を採取し、pKV7190 (またはその誘導プラスミド) を対照として pKV718 のコピー数を求めた。pKV7190 およびその誘導プラスミドのコピー数は *repE* 変異により影響を受けない。測定は培地中のトリプトファン濃度 50 μg/ml で行い、野生型 RepE の値を 1.0 としたときの相対値をグラフに示した。
- C. RepE の C 末端変異 (*repE602*) が RepE のイニシエーター活性に与える影響。

今まで述べてきた大腸菌 *dnaJ* 変異株で複製できるようになった変異ミニFの主な性質を表5にまとめた。

表5 ミニFプラスミド変異のまとめ<sup>a</sup>

<i>repE</i> allele	Transformation		Plasmid stability <sup>b</sup>	Plasmid copy no. <sup>b</sup>	RepE level <sup>b</sup>	RepE repressor activity	Rep initial activi
	<i>dnaJ259</i>	<i>ΔrhoH30</i>					
+	—	—	+	+	+	+	+
10	+	+	—	+++	ND <sup>c</sup>	±	++
18	+	—	+	+	+	+	++
26	+	+	—	+++	ND	±	++
40	ND	ND	ND	ND	ND	±	++
54	ND	ND	ND	ND	ND	—	++
105	+	+	+	+	+	—	++
<i>copA1</i>	+	±	+	++	+	+	++
<i>p110</i>	+	±	+	+	++	ND	+
602	—	—	+	+	+	+	±
40-602	+	—	+	+	+	±	+
54-602	+	+	—	+++	++	—	±

a. 表3、表4、図7 B、図8 B Cのデータを半定量的に表した。

b. 野生株 (MC4100) で求めた値を示す。 c. ND、実験不能。

### 3・7 変異 RepE の *ori2*、オペレーター DNA への結合

大腸菌の *dnaJ* 変異株で複製できる RepE 変異蛋白質を T7 RNA ポリメラーゼ系で大量発現させ、2・12の方法で精製した。RepE54、RepE54-602は単量体（後述）、これら以外はすべて野生型 RepE と同様に二量体として精製された（データ提示せず）。これらの RepE の *ori2*、オペレーター DNA への結合活性をゲルシフト法で測定した。*in vivo* で調べた性質と一致して、*ori2* DNA への結合は上昇し（野生型の2-12倍）（表6）、一部の変異 RepE のオペレーター DNA への結合は減少していた（野生型の0.3-0.5倍）。特に、*ori2* DNA への結合効率と *in vivo* のイニシエーター活性、コピー数は良く一致する（表6）。RepE105は精製過程では比較的安定で、オペレーター DNA には効率良く結合した。従って、*in vivo* で見られたリプレッサー活性の低下は、細胞内で RepE105 がやや不安定なため量が少ないことによる

と考えられる。

*in vivo* では、*repE602* 変異が共存すると RepE40、RepE54 の示す高いイニシエーター活性が抑制されたが、リプレッサー活性にはそれほど影響しない（3・6 参照）。*ori2* およびオペレーター DNA への結合活性を調べたところ、オペレーターへの結合活性には *in vivo* と同様に *repE602* 変異の影響はほとんど観察されなかった。*ori2* への結合活性は、*repE40* 変異は *repE602* 変異の影響を受けるが、*repE54* 変異ではそれほど顕著でなかった（表 6）。従って、*repE602* 変異が RepE40、RepE54 に与える影響は DNA への結合段階だけではなく、結合した後の複製開始段階にもおよぶ可能性が考えられる。

表 6 変異 RepE の *ori2* DNA 結合活性と *in vivo* の性質の比較

Mutant RepE	Relative <i>ori2</i> DNA binding efficiency <sup>a</sup>	Relative initiator activity, <i>in vivo</i> <sup>b</sup>	Relative copy numbers <sup>c</sup>
RepE <sup>+</sup>	1.0	1.0	1.0
RepE10	12.4 <sup>d</sup>	4.9	22
RepE18	2.3	2.3	1.2
RepE26	10.0 <sup>d</sup>	5.9	19
RepE40	3.5	4.9	ND <sup>e</sup>
RepE54	500	6.0	ND <sup>e</sup>
RepE105	2.3	2.9	1.9
CopA1	5.1 <sup>d</sup>	4.8	5.6
RepE602	0.8	0.7	0.7
RepE40-602	0.6	1.3	1.8
RepE54-602	500	0.4	22

a. 2・15 に記述したゲルシフト法の実験条件下で、使用した *ori2* DNA の 50 % がシフトするのに必要な RepE の量を求め、野生型 RepE の値を 1.0 として相対値で示した。

b. 図 8 B の値を再び記した。

c. 表 4 の大腸菌野生株 (MC4100) の値をそのまま記した。

d. 文献 (Kawasaki *et al.*, 1992) より引用した。

e. ND 実験不能



## 第2節 RepE 蛋白質の単量体、二量体による機能分担

### 3・8 変異 RepE54 は単量体として精製される

第1節で示したように RepE54 は、*in vivo* で RepE のイニシエーター活性が上昇し、リプレッサー活性をほとんど失っていた。このことは、RepE の2つの機能は分離できることを示している。これまで RepE の2つの機能がどのような RepE の構造と対応するのか明らかにされてなかったので、本研究では RepE54 を精製し、さらに詳細な解析を行った。RepE54 の構造がこれまで精製された野生型 RepE や多くの変異 RepE と異なることの最初の示唆は、RepE を大量発現した細胞を破碎し、遠心した後、RepE54 が上清から回収されたという実験結果から得られた。大量発現系で産生させた野生型 RepE や多くの変異 RepE は、80 % 以上が沈殿画分から回収されるが、RepE54 は 90 % 以上が上清画分にあった（図9 A 参照）。精製 RepE を FPLC サイズカラムにかけると、RepE54 は野生型 RepE よりも溶出されてくる時間が明らかに遅れた。精製した RepE の  $K_{av}$  値（分配定数）（Laue and Rhodes, 1990）から分子量を推定すると、野生型 RepE は 55 kDa、RepE54 は 27 kDa となった（データ提示せず）。

次に、我々は溶液中の RepE の分子量を、低角レーザー光散乱法（LALLS 法）により決定した。この方法では、蛋白質の形などが測定結果へほとんど影響しないと考えられている（Takagi, 1981）。求めた分子量は、野生型 RepE は 58.6 ( $\pm 1.5$ ) kDa、RepE54 は 28.3 ( $\pm 3.0$ ) kDa であった（図9 B）。沈降速度法により溶液中の RepE の沈降定数を求めると、野生型 RepE は 4.1 S、RepE54 は 2.8 S であった。塩基配列から RepE の分子量は 29 kDa と推定され（Murotsu *et al.*, 1981）、精製した野生型 RepE は他のグループからも報告されているように二量体として（Masson and Ray, 1988; Kline *et al.*, 1992; Kawasaki *et al.*, 1992）、RepE54 は単量体として安定に存在すると結論される。これらの条件下で、RepE54 は二量体が形成できないか、あるいは二量体を形成するが RepE54 の二量体は非常に不安定であると考えられる。

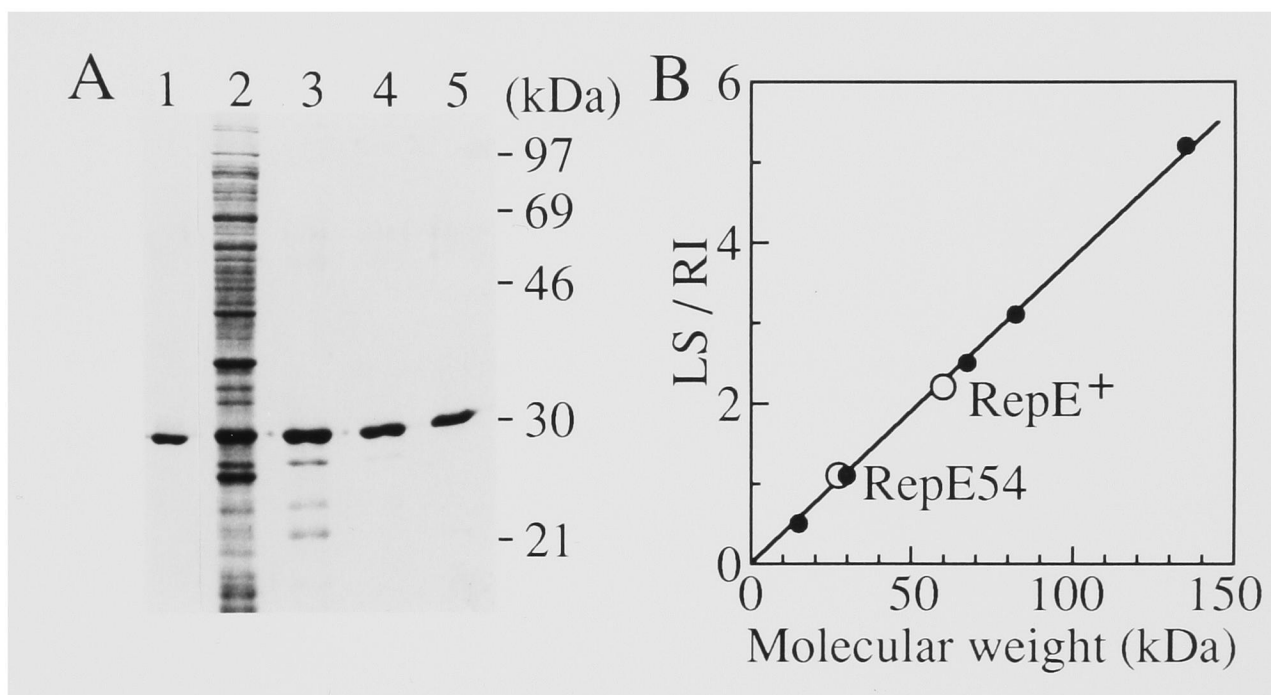


図9 RepE 精製過程のサンプルの SDS-PAGE 解析と、RepE の分子量の決定

A. 精製過程の RepE を 12 % SDS-PAGE 後、クマシーブルーで染色した。  
 レーン 1、野生型 RepE、Superose 12 溶出後；レーン 2-5、RepE54、それぞれ  
 DEAE-Sephacel 溶出後、Mono S 溶出後、Superose 12 溶出後、Mono Q 溶出後。右側  
 の数字は分子量マーカーの位置を表す。

B. 精製 RepE を低角レーザー光散乱法（LALLS 法）により測定した（2・14  
 参照）。縦軸は LALLS 計の出力（LS）と示差屈折率計の出力（RI）の比、横軸は  
 分子量。○, RepE; ●, BSA dimer (132 kDa), creatine kinase (82 kDa), BSA monomer (66  
 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), RNase A (13.7 kDa).

### 3・9 野生型 RepE、RepE54 の *ori2*、オペレーター DNA への結合活性

はじめに、野生型 RepE、RepE54 の *ori2* DNA への結合活性を *StuI*-*AluI* DNA 断片 (図 10) をプローブとして、ゲルシフト法で解析した。使用する RepE の量が増加するに従って、移動度の遅くなる 4 個のバンドが見られ、1、2、3、4 番目のバンドの量が順次増加した (図 11)。この事とバンドの移動度とから判断して、これらのバンドは *ori2* 内の 4 個のイテロンに RepE がそれぞれ 1、2、3、4 分子結合したものであると考えられる (図 11; 3・10 参照)。図 11 に見られるように、野生型 RepE の *ori2* DNA への結合活性は、以前報告されたように低かった (Tokino *et al.*, 1986; Masson and Ray, 1986, 1988; Kline *et al.*, 1992; Kawasaki *et al.*, 1992)。RepE54 は *ori2* に非常に効率良く結合し (図 11 C D)、RepE54 が *in vivo* で高いイニシエーター活性を示すことに対応する (図 8 B)。この条件下で *ori2* DNA の 50 % が DNA-RepE 複合体を形成する時の RepE の濃度を求めると、野生型 RepE は 450 fmol、RepE54 は 0.9 fmol であり、RepE54 は野生型 RepE に比べ約 500 倍 *ori2* DNA への結合効率が上昇していると考えられる。

オペレーター DNA への結合活性を *AluI*-*SmaI* 断片 (図 10) をプローブとして用いて調べると、プローブ DNA の大部分 (約 96 %) と結合するのに必要な野生型 RepE 量 (10 pmol) を使っても、RepE54 はほとんど結合できなかった (図 12)。オペレーター DNA の 50 % が DNA-RepE 複合体を形成する時の野生型 RepE の濃度は、210 fmol であり、RepE54 は少なくとも 100 倍は結合効率が減少している。この結果は、*in vivo* で RepE54 がほとんどリプレッサー活性を示さないという結果 (図 7 B) と良く一致する。

これらの結果は、RepE の単量体が *ori2* へ結合し、複製を開始するための活性型であり、二量体がオペレーターに結合し、リプレッサーとして機能するという興味深い可能性を示唆している。

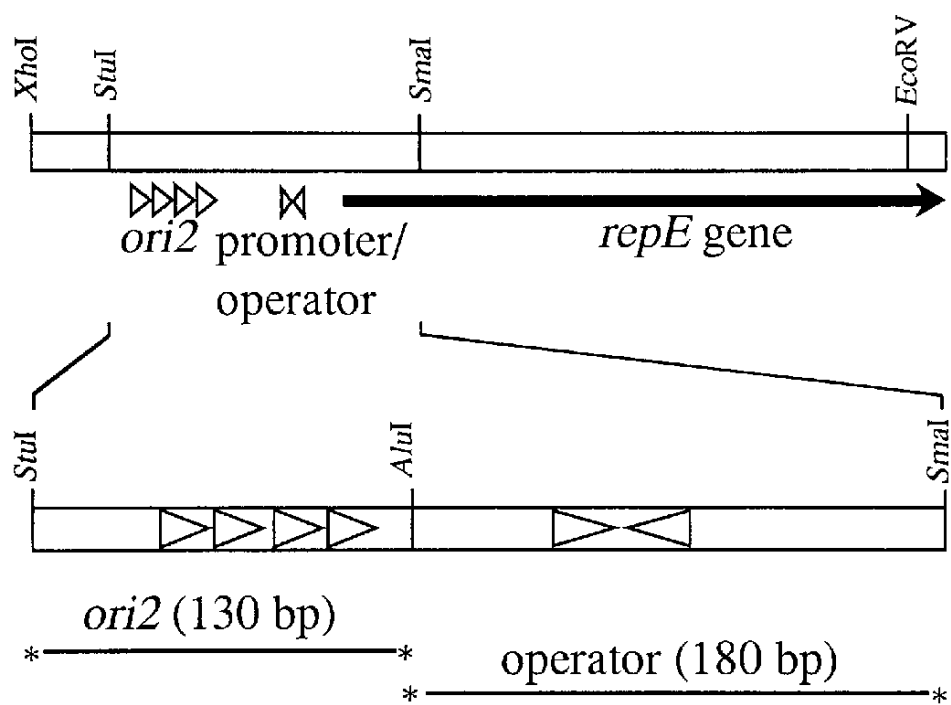


図 1 0 ゲルシフトに用いた DNA プローブ

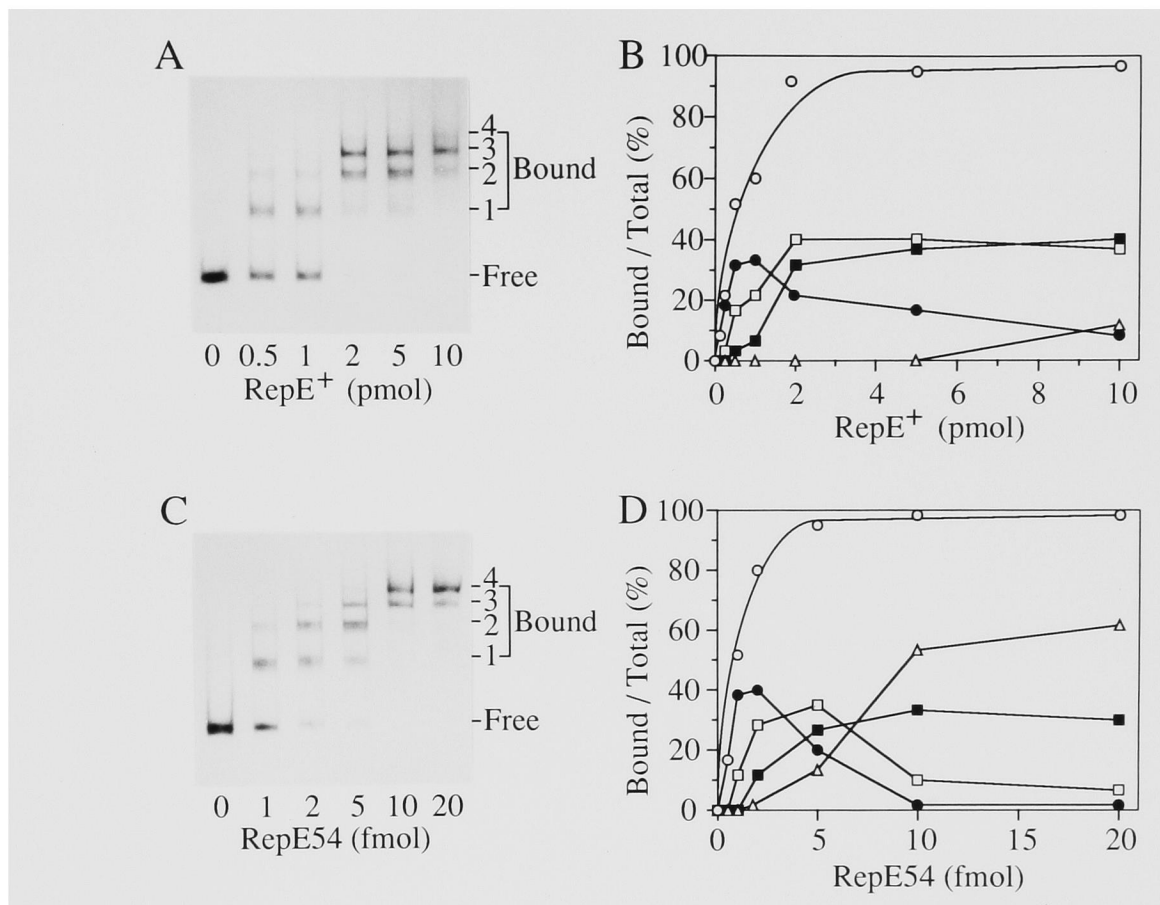


図 1 1 ゲルシフト法による RepE の *ori2*DNA への結合活性

詳細は本文を参照。A. C. DNA のバンドのオートラジオグラフ。B. D. RepE の結合した DNA と総 DNA の比で示した。値は 4 回の実験の平均値。●、バンド 1；□、バンド 2；■、バンド 3；△、バンド 4；○、4 本のバンドの合計。

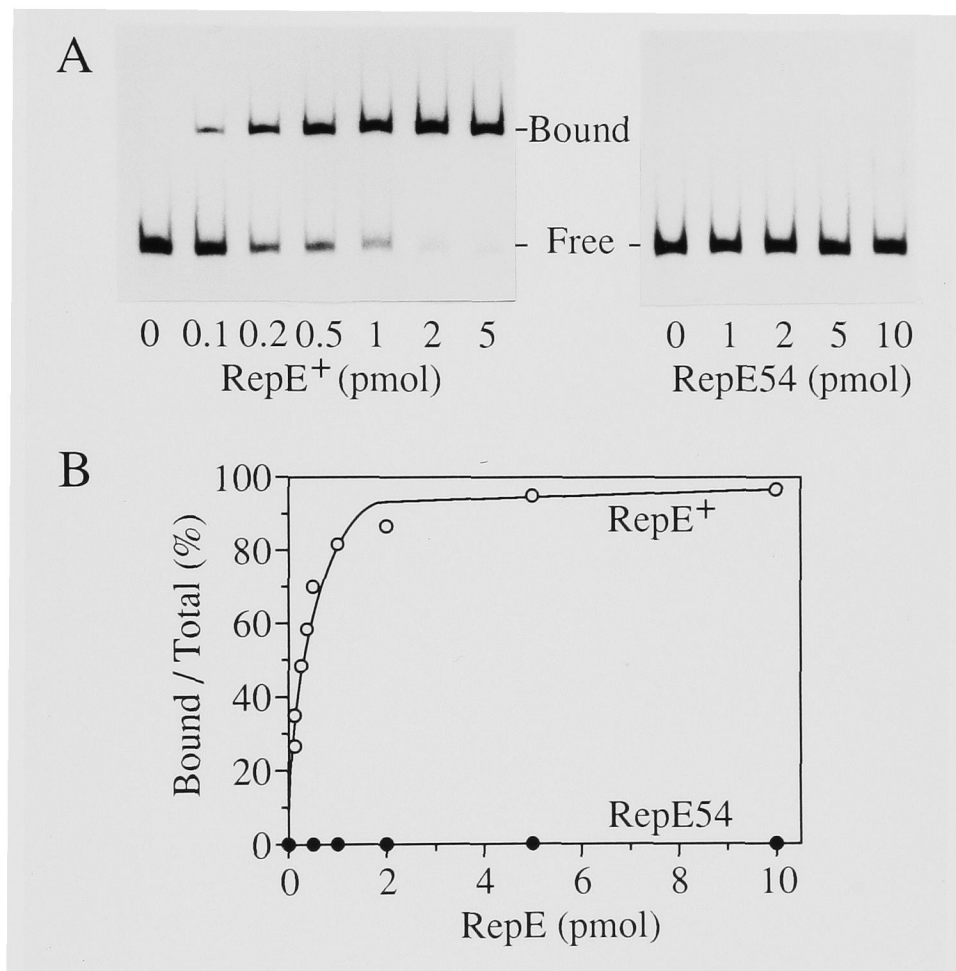


図12 ゲルシフト法による RepE のオペレーター DNA への結合活性

詳細は本文参照。A. DNA のバンドのオートラジオグラフ。B. RepE の結合した DNA と総 DNA の比で示した。値は野生型 RepE (○) が 4 回、RepE54 (●) が 2 回の実験の平均値

### 3・10 *ori2*-RepE 複合体の量比

*ori2*-RepE 複合体の量比を直接調べるために、 $[^3\text{H}]$ -RepE54 と  $[^{32}\text{P}]$ -*ori2* DNA の二重ラベル法を用いた (Yang and Nash, 1989; Schneider and Geiduschek, 1990)。ゲルシフト法により得られる4つの *ori2* DNA のバンドを切り出し、 $[^3\text{H}]$  と  $[^{32}\text{P}]$  のそれぞれの放射線活性を測定し、解析した。表7に示したように、*ori2* DNA と RepE54 のモル比はバンド1、2、3、4についてそれぞれ1、2、3、4であり、RepE 量への依存性と、移動度から期待された結果と一致していた (図11参照)。この結果は、この条件下で RepE54 が *ori2* 内の4個のイテロンに結合し、それぞれのイテロン当たり RepE54 の単量体が1個の割合で結合することを明快に示している。図11で見られるバンドの移動度が野生型 RepE と RepE54 とでほとんど変わらないことから、おそらく野生型 RepE もイテロン当たり RepE の単量体が1個の割合で結合していると考えられる。

表7 *ori2*-RepE 複合体の量比

Complex	RepE54 bound per <i>ori2</i> DNA (molar ratio)	Deduced no. of RepE54 monomer bound per iteron
band 1	1.15 (1.00)	1.15
band 2	2.42 (2.11)	1.21
band 3	3.10 (2.70)	1.03
band 4	4.67 (4.07)	1.17
free DNA	0.07 (0.06)	---

ゲルシフト反応液 (50  $\mu\text{l}$ ) には、3 pmol の  $[^{32}\text{P}]$ -*ori2* DNA (630 cpm/pmol) と 5.5-28 pmol の  $[^3\text{H}]$ -RepE54 (70 cpm/pmol) を含む。反応後、6%ゲルで電気泳動し、オートラジオグラフによって図11のバンド1から4に対応する DNA-RepE 複合体を検出し、ゲルから切り出した。各バンドの  $[^{32}\text{P}]$  と  $[^3\text{H}]$  の放射線活性を測定し、モル比を算出した。2回の実験の平均値を示した。( ) 内は、バンド1に対する相対値。

### 3. 1 1 蛋白質変性剤処理した野生型 RepE の DNA 結合活性

RepE の二量体、単量体の機能をさらに詳しく解析する目的で、野生型 RepE を蛋白質変性剤で処理した後、DNA への結合活性を調べた。塩酸グアニジン（2-6 M）処理した RepE は、変性剤濃度の増大と共に、明らかに *ori2* への結合が増大し、逆にオペレーターへの結合が減少した（表 8）。RepE を 2-6 M 尿素、1-4 M NaCl で処理した場合も、同じような効果が観察された（データ提示せず）。しかし、TritonX-100（0.5 %）、sarcosyl（0.1 %）処理した場合、RepE の DNA への結合活性には顕著な影響は見られなかった（表 8）。塩酸グアニジンの効果は、RepE と 30 °C で 30 分間反応させることに依存しており、塩酸グアニジンが DNA への結合反応やゲルシフト法の反応段階に影響しないため、RepE に直接作用していることが示唆される（表 8 の 3 列目、5 列目を比較）。

表 8 野生型 RepE の DNA 結合に与える蛋白質変性剤の効果

Treatment	DNA binding efficiency (%)	
	<i>ori2</i>	<i>repE</i> operator
none	9.4 (1.0)	45.9 (1.0)
2M guanidine-HCl	27.9 (3.0)	0.9 (0.02)
4M guanidine-HCl	53.8 (5.7)	1.3 (0.03)
6M guanidine-HCl	68.3 (7.3)	<0.03 (<0.01)
4M guanidine-HCl*	11.0 (1.2)	53.5 (1.2)
0.5% Triton X-100	8.8 (1.0)	60.4 (1.3)
0.1% sarcosyl	14.3 (1.5)	24.6 (0.5)

反応液（12  $\mu$ l : MES- 0.5 M KCl バッファー、0.1  $\mu$ g の BSA、8 pmol の野生型 RepE）に、それぞれの変性剤を加え、30 °C で 30 分間静置した。これらをバッファーで 40 倍に希釈しゲルシフト法で解析した。2 fmol の *ori2*、オペレーター DNA に対し 50、200 fmol の RepE をそれぞれ用いた。少なくとも 2 回の実験の平均値を示す。\* 30 分間静置しなかったコントロール。



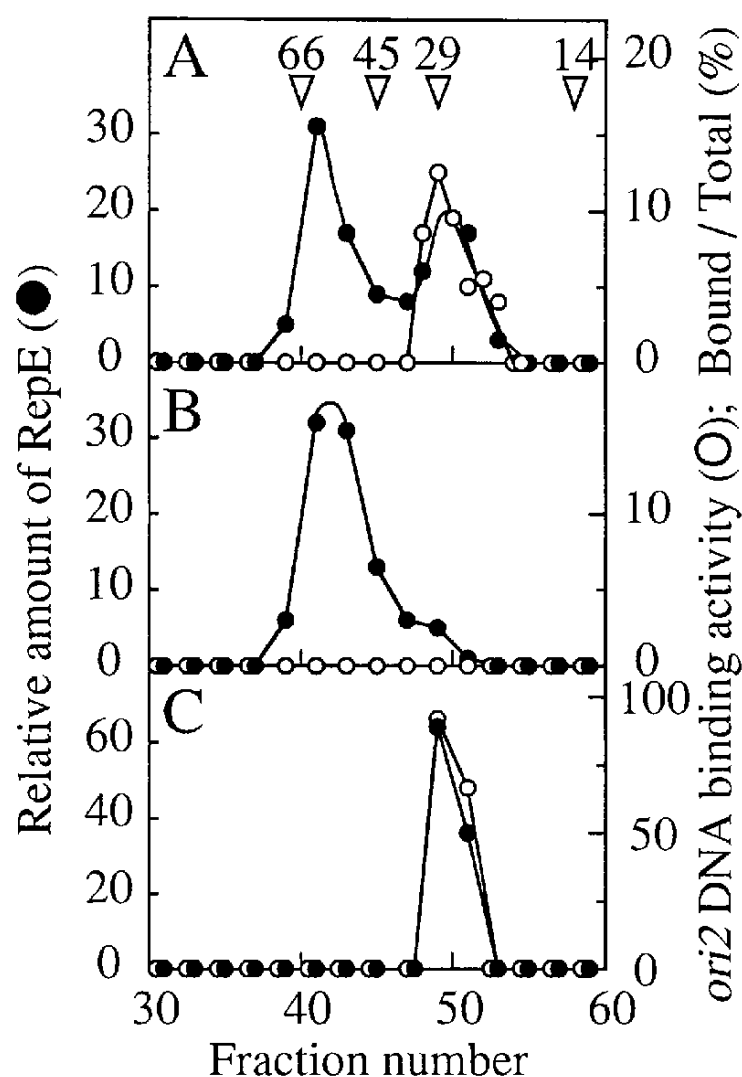


図 13 ゲル濾過による RepE 単量体、二量体の分離

A. MES-0.5 M KCl バッファー、0.1  $\mu$ g の BSA、15 pmol の野生型 RepE、4 M 塩酸グアニジンを含む変性反応液 (12  $\mu$ l) を 30  $^{\circ}$ C で 30 分間静置し、バッファーで 50 倍希釈し、サイズカラム (Superdex 75) でゲル濾過し、分画した。RepE の回収率は約 80 % である。各画分につき、RepE 量をイムノブロットングで、ori2 DNA への結合活性をゲルシフト法でそれぞれ解析した。ゲルシフトの反応液 (30  $\mu$ l) には、10 fmol の ori2 DNA と野生型 RepE (4  $\mu$ l) または RepE54 (0.4  $\mu$ l) を含む。2 回の実験の平均値を示す。矢じりはサイズマーカーの位置を示す：BSA (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), RNase A (13.7 kDa)。B. C. 未処理の野生型 RepE または RepE54 それぞれを用いて、同様の解析を行った。●、RepE の相対量 (総量に対する割合を % で示す)。○、ori2 DNA への結合活性。

### 3・12 *ori2* への結合活性は RepE 単量体にのみ検出される

4 M 塩酸グアニジンで処理した野生型 RepE (15 pmol) をサイズカラムに通し、単量体が検出されるかどうか検討した。各分画につき、RepE の量をイムノブロッティングにより、*ori2* DNA への結合活性をゲルシフト法によりそれぞれ測定した。4 M 塩酸グアニジン処理した野生型 RepE では、単量体、二量体に相当する#41-43 付近と#49-51 付近の 2 つのピークが見られた (図 1 3 A)。非処理の野生型 RepE は二量体のピークがみられ、一部単量体の肩が見られる (約 8 %) (図 1 3 B)。非処理又は 4 M 塩酸グアニジン処理した RepE54 は#49-51 に溶出する (図 1 3 C)。最も興味深いことに、*ori2* DNA への結合は RepE の単量体にのみ見られ (図 1 3)、オペレーターへの結合は二量体に見られた (データ提示せず)。

4 M NaCl、4 M 尿素処理した野生型 RepE でも同様に#49-51 付近に新たなピークがみられ、同時にその位置に顕著な *ori2* DNA への結合活性が観察された (データ提示せず)。ただし、これらの処理により生じる RepE 単量体の量は、塩酸グアニジンの場合と比較して少なかったが、単量体の持つ *ori2* への結合活性は、どの場合でもほとんど定量的に等しかった。つまり、蛋白質変性剤の種類を問わず野生型 RepE 二量体から生じる単量体は *ori2* への結合活性を示す。しかし、その活性は RepE54 単量体よりも 1 桁低い (データ提示せず)。

表 9 溶液中の野生型 RepE 単量体、二量体の存在比

Total RepE (nM)*	Monomer (%)	Deduced Kd ( $10^{-9}$ M)†
20	8	0.28
25	7	0.26
150	5	0.78
1500	< 1	< 0.3
2600	< 1	< 0.5

\* 単量体換算 †  $K_d = [\text{RepE 単量体の濃度}]^2 / [\text{RepE 二量体の濃度}]$

最後に、解離定数 ( $K_d$ ) を概算する目的で、野生型 RepE の濃度を数点とり (20 - 2600 nM)、サイズカラムで二量体、単量体の割合を測定した (表 9)。  $K_d$  は約  $1 \times 10^{-9}$  M と見積られ、この条件下で平衡は二量体に強く片寄っていることを示す。

### 3・13 結論と RepE の作業仮説

第 2 節で、我々はミニ F プラスミドの RepE は単量体、二量体という機能的に異なる少なくとも 2 つのフォームをもつことを示した。野生型 RepE の低い解離定数 (表 9) は、野生型の大部分が二量体で存在するという事実 (図 9 B) と良く一致している。野生型 RepE 二量体は *repE* 遺伝子のオペレーターに効率良く結合し、*ori2* 内のイテロンへの結合効率は非常に低い (図 1 1、図 1 2)。一方、RepE54 変異蛋白質はほとんどが単量体として得られ (図 9 B)、*ori2* 内のイテロンへは非常に効率よく結合したが (野生型 RepE の約 500 倍)、オペレーターにはほとんど結合しなかった (図 1 1、図 1 2)。さらに、野生型 RepE 二量体を蛋白質変性剤で処理すると、一部に二量体から単量体への解離が見られ、*ori2* への結合が上昇し、オペレーターへの結合は減少した。二量体と単量体を分離して調べると、単量体画分にのみ高い *ori2* への結合活性が見られた (表 8、図 1 3)。この条件で、RepE54 の 1 分子が 1 個のイテロンに結合しており、この量比は野生型 RepE でもほとんど変わらない (表 7；3・10 参照)。これらの結果は、野生型 RepE 二量体で見られる *ori2* への結合活性は実験に使用した RepE に存在するごく少量の単量体によるものであり、二量体そのものは *ori2* へ結合しないことを示している。従って、RepE 単量体は *ori2* 結合の活性型と考えられる。*ori2* への結合は RepE のイニシエーター機能に必須であり、RepE の二量体から単量体への変換反応はイニシエーター機能の活性化に極めて重要なステップと考えられる。

第 1 節で示したように、*repE* 変異によりミニ F プラスミドの DnaK、DnaJ、GrpE 熱ショック蛋白質の要求性が失われること (表 3) は、これらの熱ショック蛋白質が RepE の活性化に協同して働く可能性を示している。これらの変異ミニ F は、*in*

*vivo* で RepE のイニシエーター活性の上昇がみられ、いくつかはリプレッサー活性が低下していた（図 1 1、図 1 2）。これらの変異 RepE 蛋白質は RepE54 を除き、二量体として精製され、*in vivo* の性質と一致して、*ori2* DNA への結合は上昇し、オペレーター DNA への結合は減少していた（表 6）。おそらくこれらの変異 RepE の二量体は野生型に比べ単量体に解離しやすくなっていると思われる。

本研究で得られた知見を総合すると、ミニ F プラスミドの RepE の制御について以下のような作業仮説がたてられる（図 1 4）。細胞内で、RepE の大部分は二量体として存在し オペレーター へ結合し、リプレッサーとして自己遺伝子の転写抑制を行う。このため細胞内の RepE は低いレベルに保たれる。RepE の二量体が単量体に変換されると、単量体は *ori2* 内のイテロンへ結合し、DNA 複製を開始するイニシエーターとして機能する。この RepE の二量体から単量体への変換に、DnaJ、DnaK、GrpE 熱ショック蛋白質が分子シャペロンとして働いている可能性が高い。

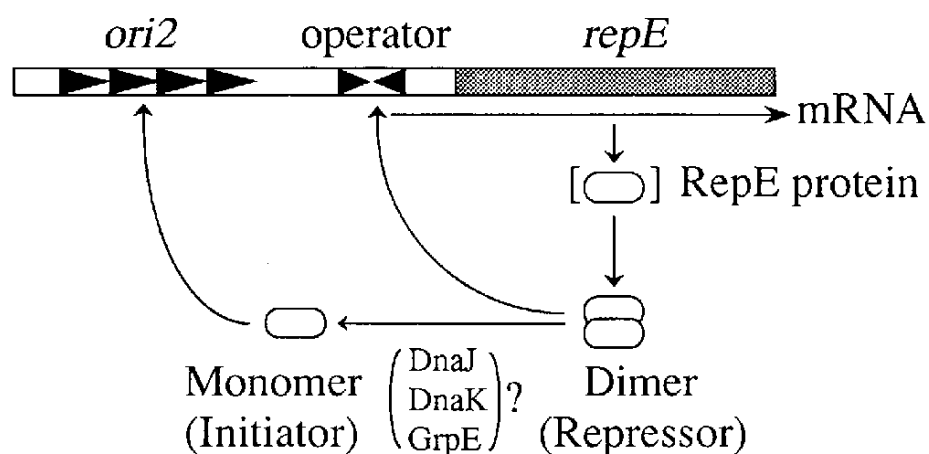


図 1 4 ミニ F プラスミドの複製制御における RepE の作業仮説

説明は本文参照。

## 第4章 考察

### 第1節 ミニFプラスミド複製における熱ショック蛋白質の役割

我々の研究室は以前に、大腸菌の *dnaK*、*dnaJ*、*grpE* 熱ショック蛋白質変異株ではミニFプラスミドは複製できないが、トランスに過剰量の RepE を供給すればこれらの変異株でミニFは複製できることを示した (Kawasaki *et al.*, 1990)。本研究で分離した *repE* 遺伝子のオペレーター／プロモーター領域の変異を持つミニF (*repEp110*) は、これらの大腸菌変異株で複製できた (表3)。この変異ミニFは以前、*in vivo* で *repE* 遺伝子の自己転写抑制ができない変異体として報告されたものと同じ塩基置換をおこしていた (Rokeach *et al.*, 1985)。ゲルシフト法で *repEp110* 変異を持つオペレーター DNA 断片への結合活性を測定すると、野生型 RepE はほとんど結合できず (石合 未発表)、*in vivo* の結果と良く一致する。結果的に、細胞内に多くの RepE が存在すること (表4) が、この変異ミニFが大腸菌の熱ショック蛋白質変異株で複製できる主な理由であろう。この変異プラスミドは、野生株でのプラスミドコピー数はそれほど上昇せず、また、 $\Delta rpoH$  変異株では複製できない (表3、表4)。

一方、*repE* 遺伝子のコーディング領域におこったミニFプラスミド変異は、*in vivo* で RepE のイニシエーター活性の上昇がみられ、いくつかはリプレッサー活性が低下していた (図11、図12)。これらの変異 RepE 蛋白質を精製して DNA への結合を調べると、*in vivo* の性質と一致して、*ori2* DNA への結合は上昇し、オペレーター DNA への結合は減少していた (表6)。従って、これらの変異ミニFが大腸菌の熱ショック蛋白質変異株で複製できる主な理由は、プラスミド変異により RepE の *ori2* への結合が上昇し、結果的にイニシエーター活性が上昇することであろう。以前の  $\Delta rpoH$  変異株で複製可能な変異ミニFの選択では hyper active RepE し

か得られなかった (Kawasaki *et al.*, 1991) が、本研究では、イニシエーター活性が中くらいに高く、 $\Delta rpoH$  変異株では複製できないミニ F 変異 (*repE105*、*repE40-602*) が得られたことは特記に値する。

ミニ F プラスミド複製に必要な DnaA、DnaB、DnaC それぞれの変異株において、*repE10*、*repE18*、*repE26* 変異ミニ F は野生型ミニ F と同様複製できなかった (石合、和田 未発表)。さらに、*dnaA*、*dnaB*、*dnaC* 変異株では熱ショック蛋白質変異株の場合と異なり、野生型 RepE を過剰に供給してもミニ F は複製できなかった (和田 未発表)。また、調べた変異プラスミド (*repE10*、*repE26*) は、Hu 蛋白質をコードする *hupA*、*hupB* 遺伝子の変異株でも複製できなかった (川崎 未発表)。以上のことは、これらの変異ミニ F には、依然として DnaA、DnaB、DnaC、Hu 蛋白質の要求性が残り、このことはミニ F プラスミド複製において DnaJ、DnaK、GrpE 蛋白質は DnaA、DnaB、DnaC、Hu 蛋白質とは異なる反応 (おそらく RepE の活性化) に要求されることを示唆している。

DNA 複製における DnaK、DnaJ、GrpE 熱ショック蛋白質の役割は  $\lambda$  ファージ、P 1 プラスミドの系で良く研究されている (Georgopoulos *et al.*, 1990 参照)。P 1 プラスミドのイニシエーター蛋白質 (RepA) 二量体は DnaJ 二量体と安定な複合体を形成し、DnaK、DnaJ、GrpE と ATP の存在下で活性化され、*ori* 領域の DNA に結合するが、この活性化には RepA の二量体から単量体への変換を伴うことが報告されている (Wickner, 1990; Wickner *et al.*, 1991a, 1991b, 1992)。しかしながら、最近の報告では RepA 二量体の解離定数の測定結果から、RepA が単量体として存在し、熱ショック蛋白質により活性型単量体に変換される可能性も示唆されている (DasGupta *et al.*, 1993)。

## 第2節 RepE 蛋白質の構造と機能

本研究で我々はミニFプラスミドの RepE に単量体、二量体という機能的に異なる少なくとも2つのフォームがあることを示した。RepE 単量体は *ori2* 内のイテロンへ非常に効率よく結合し、RepE 二量体は *repE* 遺伝子のオペレーターに効率良く結合した。ミニFプラスミドの複製制御における RepE の機能分担について、これまでの実験結果から3・13で述べたような作業仮説をたてた(図14)。

この仮説と関連して、我々は最近、*in vitro* で RepE は DnaJ (DnaK、ATP) の存在下で活性化され、*ori2*、オペレーター DNA へ効率良く結合することを報告した (Kawasaki *et al.*, 1992; 和田 未発表)。また、RepE54 の *ori2* への結合活性も DnaJ (DnaK、ATP) により促進された(石合、和田 未発表)。また、野生型 RepE 二量体から生じた単量体の *ori2* への結合活性は、RepE54 単量体より明らかに低い(図13参照)。これらのことは、RepE 二量体の解離(モノマー化)以外にも分子シャペロンに依存する(あるいはしない)活性化機構が存在する可能性を示している。この場合、RepE54 は部分的に活性化された単量体と考えればよい。この考えは、ミニP1のRepAは単量体として存在し、熱ショック蛋白質によって活性型単量体に変換されるというごく最近の推測と類似している (DasGupta *et al.*, 1993)。

ミニFプラスミドの RepE の異なる2つの機能が、二量体、単量体により担われていることは、RepE の2つの機能を説明する Trawick and Kline の「2段階分子モデル (two-stage molecular model)」を連想させる。彼らは、normal (unmodified) RepE はリプレッサーとして働き、このうちのごく少量の RepE が modified RepE へ変換し、*ori2* に結合し、イニシエーターとして機能すると考えた (Trawick and Kline, 1985)。normal RepE (リプレッサー) は二量体、modified RepE (イニシエーター) は単量体と考えれば、我々の結果は、このモデルと良く一致する。

いずれにしても本研究の結果は、ミニFプラスミドの複製開始制御を考える上で、

RepE の構造変換（二量体→単量体）による機能変換という正の制御が重要であることを示している。さらに、負の制御も働いていると考えられるが、これは今後明らかにしなければならない問題である。

ミニFプラスミドと複製様式が類似したミニ P1、pSC101、R6K などの複製開始因子も、ミニFの RepE と同様に、複製を開始するイニシエーターと自己遺伝子の転写抑制を行うリプレッサーの主要な2つの機能をもつ。これらの複製開始因子も多くが二量体で精製され、分子量も RepE と似ているが、一次構造上の類似性は見られない (Kornberg and Baker, 1991 参照)。興味深いことに、これらのプラスミドでも、高いコピー数を示す変異の大部分がミニFと同様に、複製開始因子の中央部分に集中し、その変異の多くは、イニシエーター活性、リプレッサー活性に影響が見られる (for mini F; Hellsberg *et al.*, 1985; Trawick and Kline, 1985; Bex *et al.*, 1986; Kawasaki *et al.*, 1991; Ishiai *et al.*, 1992: for mini P1; Scott *et al.*, 1982; Baumstark *et al.*, 1984; Austin *et al.*, 1985; Froehlich and Scott 1988: for R6K; Stalker *et al.*, 1983; Inuzuka and Wada, 1985: for pSC101; Armstrong *et al.*, 1984; Xia *et al.*, 1991, 1993: for Rts1; Kamio *et al.*, 1984: for RK2; Durland *et al.*, 1990; Haugan *et al.*, 1992)。また、変異イニシエーター蛋白質を精製し、DNA への結合活性を調べた報告もある (for mini F; Kline *et al.*, 1992; Kawasaki *et al.*, 1992: for mini P1; Sozhamannan and Chatteraj, 1993: for R6K; Filutowicz *et al.*, 1986; Miron *et al.*, 1992; York and Filutowicz., 1993: for pSC101; Xia *et al.*, 1991, 1993; Manen *et al.*, 1992: for RK2; Lin and Helinski, 1992)。しかし、本研究で分離した *repE54* 変異のようにイニシエーター、リプレッサー活性を分離できるような表現型を示すものはまだ報告されておらず、しかも単量体として精製される RepE54 が分離されたことは特記に値する。本研究で示したように複製開始因子が二量体でオペレーターに結合し、単量体で *ori* へ結合することは、pSC101 でも報告されている。pSC101 のイニシエーター蛋白質 (RepA) は、ヘテロ二量体を使ったゲルシフト法による解析からオペレーターに二量体で結合し、



*ori* へ単量体で結合すると結論している (Manen *et al.*, 1992)。P 1 の場合、*repA* 遺伝子のオペレーターは *ori* の一部と重複しているため、RepA が *ori* へ単量体で結合し、2 つの機能を発揮すると考えられ (Chattoraj *et al.*, 1985; Wickner *et al.*, 1991b)、プラスミドにより少しずつバリエーションがあるようである。その他のプラスミドの複製開始因子の機能と構造については、まだ報告されていない。

### 第 3 節 RepE の機能ドメイン

高いイニシエーター活性を示すミニ F プラスミドの *repE* 変異は、RepE の 92-134 残基の限られた狭い領域に 1 塩基置換をおこしており、そのうち幾つかは同時にリプレッサー活性が低下していた。これは、ミニ F のコピー数調節に 92-129 残基領域が重要であろうという以前からの主張と良く一致する (Kawasaki *et al.*, 1991)。

*repE54* 変異は Arg<sub>117</sub> が Pro に変わる 1 塩基置換変異であるので、Arg<sub>117</sub> は二量体形成に関わると思われる。もちろん、変異が蛋白質のコンフォメーションに影響し、間接的に二量体形成に影響してる可能性もおおいに考えられる。いずれにせよ、二量体形成に関わるドメインの決定は明かにすべき今後の課題である。

*repE10*、*repE40* 変異は、Glu<sub>92</sub> がそれぞれ Lys 残基、Ala 残基に変わる変異である。また、以前に  $\Delta$ *rpoH* 変異株で複製可能な変異ミニ F プラスミドとして分離した *repE22* 変異も、この Glu<sub>92</sub> が Gly 残基に変わる変異であった (Kawasaki *et al.*, 1991)。これら 3 種の *repE* 変異は全て、イニシエーター活性が上昇し、かつ、リプレッサー活性の減少が見られたことは、興味深い。*repE18*、*copA1* 変異は、Glu<sub>99</sub>、Glu<sub>100</sub> のそれぞれがどちらも Lys 残基へ置換する変異であり、このどちらもイニシエーター活性は上昇するがリプレッサー活性は野生型と変わらなかった。また、*repE18*、*copA1* の二重変異も同様であった (石合 未発表)。すなわち、これらの残基はイニシエーター機能に特異的に機能するらしい。

RepEの機能に関連した別の、非常に興味深い知見は RepE40、RepE54（それぞれ RepE の 92、117 残基に変異を持つ）の高いイニシエーター活性が、RepE の C 末端の *repE602* フレームシフト変異により抑制されること（intergenic suppression）である。*repE602* 変異単独ではイニシエーター活性にそれほど顕著な影響を与えない（図11 C）。一方、*repE602* 変異は RepE40、RepE54 のリプレッサー機能にほとんど影響を与えなかった（データ提示せず）。また、*repE40* 変異と同じ残基（Glu<sub>92</sub>）が Gly に変わっている *repE22* 変異も RepE の C 末端の *repE317* 変異によりイニシエーター活性が減少したが、*repE317* 変異単独ではイニシエーター活性の顕著な減少はみられなかった（川崎 未発表）。以上の結果は、RepE のイニシエーター機能特異的に RepE の中央領域と C 末端とが相互作用することを強く示唆する。なお、精製 RepE のゲルシフト法による解析では、RepE40、RepE54 の *ori2* への結合効率に C 末端の *repE602* 変異が与える影響は RepE40 では観察されたが、RepE54 にはそれほど顕著ではなかった（表 6）。従って、RepE の中央領域と C 末端との相互作用は *ori2* への結合だけではなく、結合した後の段階でも影響するらしい。考えられる RepE の機能としては、DNA のベンディング、アンワインディング（二本鎖 DNA の開裂）（川崎 未発表）、プライマー合成等があり、今後ぜひ明かにすべき問題である。

#### 第 4 節 今後の問題点

本研究により RepE の二量体、単量体がそれぞれ異なる DNA 領域（オペレーター、イテロン）に結合することが明確に示されたが、DNA 結合蛋白質として RepE をとらえた場合、同一の蛋白質のフォームの違いにより、結合する DNA 配列の好みが異なることは非常に興味深い。RepE と DNA の相互作用を結晶解析などの物理化学的方法で検討することも有効であろう。大腸菌の比較的低いコピー数のプラスミドやファージ、あるいは大腸菌染色体複製のイニシエーター蛋白質は機能的にミニ F

の RepE と類似している (Kornberg and Baker, 1992 参照) が、これらのイニシエーター蛋白質間の一次構造上の類似性は少なく、既知の DNA 結合モチーフも見いだせない。これらはまだ知られていない新しいタイプの DNA 結合モチーフを持つものかもしれない。

次に、ミニFプラスミド複製における熱ショック蛋白質 DnaK、DnaJ、GrpE の役割を分子レベルでより直接的に調べる必要がある。最近、これらの蛋白質の「分子シャペロン」としての機能が注目され、また、これらのホモログが真核生物でも続々と見つかってきている (Georgopoulos *et al.*, 1990; Gross *et al.*, 1990; Caplan *et al.*, 1993 参照)。熱ショック蛋白質と RepE、宿主由来の複製因子等の相互作用もまだほとんどわかっていない。その解明に、変異蛋白質を組み合わせた生化学的な解析や、遺伝解析も有力な手段となろう。

また、RepE の機能ドメインの問題もある。前節でも触れたが、RepE の中央領域、C 末端領域、二量体形成領域、DNA 結合領域など、RepE の機能、蛋白質、DNA との相互作用などと密接に関わる問題でもあるが、まだほとんどが未解決である。生化学的な解析に加え、変異体を多数分離、解析するなど遺伝学的データを多く蓄積する必要がある。

最後に、ミニFプラスミドの複製制御と我々の作業仮説との対応を検討することが非常に重要である。現段階では、RepE の二量体から単量体への変換と、複製制御、コピー数調節については全く対応づけられていない。F プラスミドは宿主染色体とは異なるが細胞周期の決まった時期に複製することが報告されており (Keasling *et al.*, 1991; Koppes, 1992)、この問題はおそらく細胞周期制御と密接に関連していると思われる。今後、宿主大腸菌の増殖とも関連づけて、ミニFプラスミド複製の制御機構を解析する必要がある。

## 参考文献

- Akiyama, M., Horiuchi, T., and Sekiguchi, M. (1987). Molecular cloning and nucleotide sequence of the *mutT* mutator of *Escherichia coli* that cause A:T to C:G transversion. *Mol. Gen. Genet.* **206**, 9-16.
- Ang, D., Chandrasekhar, G. N., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1986). *Escherichia coli* *grpE* gene codes for heat shock protein B25.3, essential for both  $\lambda$  DNA replication at all temperatures and host growth at high temperature. *J. Bacteriol.* **167**, 25-29.
- Armstrong, K. A., Acosta, R., Ledner, E., Machida, Y., Pancotto, M., McCormick, M., Ohtsubo, H., and Ohtsubo, E. (1984). A  $37 \times 10^3$  molecular weight plasmid-encoded protein is required for replication and copy number control in the plasmid pSC101 and its temperature-sensitive derivative pHS1. *J. Mol. Biol.* **175**, 331-347.
- Austin, S. J., Mural, R. J., Chattoraj, D. K., and Abels, A. L. (1985). *Trans*- and *Cis*-acting elements for the replication of P1 miniplasmids. *J. Mol. Biol.* **183**, 195-202.
- Baumstark, B. R., Lowery, K., and Scott, J. R. (1984). Location by DNA sequence analysis of *cop* mutations affecting the number of plasmid copies of prophage P1. *Mol. Gen. Genet.* **194**, 513-516.
- Bex, F., Piérard, P., Desmyter, A., Dréze, P., Colet, M., and Couturier, A. (1986). Mini-F E protein: the carboxy-terminal end is essential for *E* gene repression and mini-F copy number control. *J. Mol. Biol.* **183**, 293-303.
- Bramhill, D., and Kornberg, A. (1988). A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell* **54**, 915-918.
- Bukau, B., and Walker, G. C. (1989).  $\Delta$ *dnaK52* mutants of *Escherichia coli* have defects in chromosome segregation and plasmid maintenances at normal growth temperatures. *J. Bacteriol.* **171**, 6030-6038.
- Casadaban, M. J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage Lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**, 541-556.
- Caplan, A. J., Cyr, D. M., and Douglas, M. G. (1993). Eukaryotic homologues of *Escherichia coli* *dnaJ*: a diverse protein family that functions with HSP70 stress proteins.

Mol. Biol. Cell. 4, 555-563.

Chang, A. C. Y., and Cohen, S. N. (1978). J. Bacteriol. 134, 1141-1156.

Chattoraj, D. K., Snyder, K. M., and Abeles, A. L. (1985). P1 plasmid replication: multiple functions of RepA protein at the origin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 2588-2592.

DasGupta, S., Mukhopadhyay, G., Papp, P. P., Lewis, M. S., and Chattoraj, D. K. (1993). Activation of DNA binding by the monomeric form of the P1 replication initiator RepA by heat shock proteins DnaJ and DnaK. J. Mol. Biol. 232, 23-34.

Degnen, G. E., and Cox, E. C. (1974). Conditional mutator gene in *Escherichia coli*: isolation, mapping, and effector studies. J. Bacteriol. 117, 477-487.

Durland, R. H., Toukdarian, A., Fang, F., and Helinski, D. R. (1990). Mutations in the *trfA* replication gene of the broad-host-range plasmid RK2 result in elevated plasmid copy numbers. J. Bacteriol. 172, 3854-3867.

Ezaki, B., Ogura, T., Mori, H., Niki, H., and Hiraga, S. (1989). Involvement of DnaK protein in mini-F plasmid replication: temperature-sensitive *seg* mutations are located in the *dnaK* gene. Mol. Gen. Genet. 218, 183-189.

Filutowicz, M., Uhlenhopp, E., and Helinski, D. R. (1986). Binding of purified wild-type and mutant  $\pi$  initiator proteins to a replication origin region of plasmid R6K. J. Mol. Biol. 187, 225-239.

Froehlich, B. J., and Scott, J. R. (1988). A single amino acid difference between Rep protein of P1 and P7 affects plasmid copy number. Plasmid. 19, 121-133.

Georgopoulos, C., Ang, D., Liberek, K., and Zylicz, M. (1990). Properties of the *Escherichia coli* heat shock proteins and their role in bacteriophage  $\lambda$  growth. in Stress proteins in biology and medicine, R. I. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 191-222. .

Gross, C. A., Straus, D. B., Erickson, J. W., and Yura, T. (1990). The function and regulation of heat shock proteins in *Escherichia coli*. in Stress proteins in biology and medicine, R. I. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 167-189.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580.

Hansen, E. B., and Yarmolinsky, M. B. (1986). Host participation in plasmid maintenance: dependent upon *dnaA* of replicons derived from P1 and F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 4423-4427.

Hashimoto, T., and Sekiguchi, M. (1976). Isolation of temperature-sensitive mutants of R plasmid by in vitro mutagenesis with hydroxylamine. J. Bacteriol. 127, 1561-1563.

Haugan, K., Karunakaran, P., Blanty, J. M., and Valla, S. (1992). The phenotypes of temperature-sensitive mini-RK2 replicons carrying mutations in the replication control gene *trfA* are suppressed nonspecifically by intragenic *cop* mutants. J. Bacteriol. 174, 7026-7032.

Helsberg, M., Ebbers, J., and Eichenlaub, R. (1985). Mutations affecting replication and copy number control in plasmid mini-F both reside in the gene for the 29-kDa protein. Plasmid 14, 53-63.

Hupp, T. R., and Kaguni, J. H. (1993a). Activation of DnaA5 protein by GrpE and DnaK heat shock proteins in initiation of DNA replication in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 268, 13137-13142.

Hupp, T. R., and Kaguni, J. H. (1993b). Activation of mutant forms of DnaA protein of *Escherichia coli* by DnaK and GrpE proteins occurs prior to DNA replication. J. Biol. Chem. 268, 13143-13150.

Hwang, D., S., Crooke, E. and Kornberg, A. (1990). Aggregated dnaA protein is dissociated and activated for DNA replication by phospholipase or dnaK protein. J.Biol.Chem. 265, 19244-19248.

Hwang, D., S., and Kaguni, J. M. (1991). dnaK protein stimulates a mutant form of dnaA protein in *Escherichia coli* DNA replication. J.Biol.Chem. 266, 7537-7541.

Ikeda, E., and Toh-e., A. (1993). Rst1 protein is a yeast homologue of *Escherichia coli* heat shock protein GrpE and is required for maintenance of mitochondrial function. 第 16 回日本分子生物学会年会要旨集、pp. 151.

Inuzuka, M., and Wada, Y. (1985). A single amino acid alteration in the initiator protein is

responsible for the DNA overproduction phenotype of copy number mutants of plasmid R6K. *EMBO J.* 4, 2301-2307.

Ishiai, M., Wada, C., Kawasaki, Y., and Yura, T. (1992). Mini-F plasmid mutants able to replicate in *Escherichia coli* deficient in the DnaJ heat shock protein. *J. Bacteriol.* 174, 5597-5603.

Jacob, B., Brenner, S., and Cuzin, F. (1963). On the process regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Quant. Biol.* 28, 329-348.

Kamio, Y., Tabuchi, Y., Itoh, Y., Katagiri, H., and Terawaki, Y. (1984). Complete nucleotide sequence of mini-Rts1 and its copy mutant. *J. Bacteriol.* 158, 307-312.

Kawasaki, Y., Wada, C., and Yura, T. (1990). Roles of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK, DnaJ and GrpE in mini-F plasmid replication. *Mol. Gen. Genet.* 220, 277-282.

Kawasaki, Y., Wada, C., and Yura, T. (1991). Mini-F plasmid mutants able to replicate in the absence of  $\sigma^{32}$ : mutations in the *repE* coding region producing hyperactive initiator protein. *J. Bacteriol.* 173, 1064-1072.

Kawasaki, Y., Wada, C., and Yura, T. (1992). Binding of RepE initiator protein to mini-F DNA origin (*ori2*): enhancing effects of *repE* mutations and DnaJ heat shock protein. *J. Biol. Chem.* 267, 11520-11524.

Keasling, J. D., Palsson, B. O., and Cooper, S. (1991). Cell-cycle-specific F plasmid replication: regulation by cell size control of initiation. *J. Bacteriol.* 173, 2673-2680.

Kline, B. C. (1985). A review of mini-F plasmid maintenance. *Plasmid* 14, 1-16.

Kline, B. C., Kogoma, T., Tam, J. E., and Shields, M. S. (1986). Requirement of the *Escherichia coli dnaA* gene product for plasmid F maintenance. *J. Bacteriol.* 168, 440-443.

Kline, B. C., Sandhu, G. S., Eckloff, B. W., and Aleff, R. A. (1992). Site-specific proteolysis of mini-F plasmid replication protein RepE destroys initiator function and generates an incompatibility substance. *J. Bacteriol.* 174, 3004-3010.

Koppes, L. J. H. (1992). Nonrandom F-plasmid replication in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 174, 2121-2123.

Kornberg, A., and Baker, T. (1992). in DNA replication. (New York: W. H. Freeman and company), pp. 637-687.

Kusukawa, N., and Yura, T. (1988). Heat shock protein GroE of *Escherichia coli*: key protective roles against thermal stress. *Genes Dev.* 2, 874-882.

Laue, T. M. and Rhodes, D. G. (1990). in *Methods in enzymology*, vol. 182, M. P. Deutscher, ed. (San Diego, CA: Academic Press), pp. 566-587

Lin, J., and Helinski, D. R. (1992). Analysis of mutations in *trfA*, the replication initiation gene of the broad-host-range plasmid RK2. *J. Bacteriol.* 174, 4110-4119.

Maki, S., Kuribayashi, M., Miki, T., and Horiuchi, T. (1983). An amber replication mutant of F plasmid mapped in the minimal replication region. *Mol. Gen. Genet.* 191, 231-237.

Manen, D., Upegui-Gonzalez, L.-C., and Caro, L. (1992). Monomers and dimers of the RepA protein in plasmid pSC101 replication: domains in RepA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 8923-8927.

Masson, L., and Ray, D. S. (1986). Mechanism of autonomous control of the *Escherichia coli* F plasmid: different complexes of the initiator/repressor protein are bound to its operator and to an F plasmid replication origin. *Nucleic Acids Res.* 14, 5693-5711.

Masson, L., and Ray, D. S. (1988). Mechanism of autonomous control of the *Escherichia coli* F plasmid: purification and characterization of the *repE* gene product. *Nucleic Acids Res.* 16, 413-424.

Miller, J. H. (1972). in *Experiments in molecular genetics*, (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 352-355.

Miron, A., Mukherjee, S., and Bastia, D. (1992). Activation of distant replication origins in vivo by DNA looping as revealed by a novel mutant form of an initiator protein defective in cooperativity at a distance. *EMBO J.* 11, 1205-1216.

Muraïso, K., Tokino, T., Murotsu, T., and Matsubara, K. (1987). Replication of mini-F plasmid in vitro promoted by purified E protein. *Mol. Gen. Genet.* 206, 519-521.



- Murakami, Y., Ohmori, H., Yura, T., and Nagata, T. (1987). Requirement of the *Escherichia coli* *dnaA* gene function for *ori-2*-dependent mini-F plasmid replication. *J. Bacteriol.* **169**, 1724-1730.
- Murotsu, T., Matsubara, K., Sugisaki, H., and Takanami, M. (1981). Nine unique repeating sequences in a region essential for replication and incompatibility of the mini-F plasmid. *Gene* **15**, 257-271.
- Murotsu, T., Tsutsui, H., and Matsubara, K. (1984). Identification of the minimal essential region for the replication origin of mini-F plasmid. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 373-378.
- Olsen, P. H., Esmon, N. L., Esmon, C. T., and Laue, T. M. (1992).  $\text{Ca}^{2+}$  dependence of the interactions between protein C, thrombin, and the elastase fragment of thrombomodulin. Analysis by ultracentrifugation. *Biochemistry* **31**, 746-754.
- Rokeach, L. A., Sogaard-Andersen, L., and Molin, S. (1985). Two functions of the *E* protein are key elements in the plasmid F replication control system. *J. Bacteriol.* **164**, 1262-1270.
- Sakakibara, Y. (1988). The *dnaK* gene of *Escherichia coli* functions in initiation of chromosome replication. *J. Bacteriol.* **170**, 972-979.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). in *Molecular cloning: a laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Lab.).
- Schneider, G. J., and Geiduschek, E. P. (1990). Stoichiometry of DNA binding by the bacteriophage SPO1-encoded typeII DNA-binding protein TF-1. *J. Biol. Chem.* **265**, 10198-10200.
- Scott, J. R., Kropf, M. M., Padolsky, L., Goodspeed, J. K., Davis, R., and Vapnek, D. (1982). Mutants of plasmid prophage P1 with elevated copy number: isolation and characterization. *J. Bacteriol.* **150**, 1329-1339.
- Sell, S. M., Eisen, C., Ang, D., Zylicz, M., and Georgopoulos, C. (1990). Isolation and characterization of *dnaJ* null mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 4827-4835.
- Silhavy, T. J., Berman, M. L., and Enquist, L. W. (1984). in *Experiments with gene fusions*. (Cold Spring Harbor, N Y: Cold Spring Harbor Lab.).

Søgaard-Andersen, L., Rokeach, L. A., and Molin, S. (1984). Regulated expression of a gene important for replication of plasmid F in *E. coli*. *EMBO J.* 3, 257-262.

Sozhamannan, S., and Chattoraj, D. K. (1993). Heat shock proteins DnaJ, DnaK, and GrpE stimulate P1 plasmid replication by promoting initiator binding to the origin. *J. Bacteriol.* 175, 3546-3555.

Stalker, D. M., Filutowicz, M., and Helinsky, D. R. (1983). Release of initiation control by a mutational alteration in the R6K  $\pi$  protein required for plasmid DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 5500-5504.

Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990). in *Methods in enzymology*, vol. 185, Goeddel, D. V., ed, (San Diego, CA: Academic Press), pp. 60-89.

Takagi, T. (1981). Confirmation of molecular weight of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase using the low angle laser light scattering technique in combination with high pressure silica gel chromatography. *J. Biochem.* 89, 363-368.

Tilly, K., and Yarmolinsky, M. (1989). Participation of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaJ, DnaK, and GrpE in P1 plasmid replication. *J. Bacteriol.* 171, 6025-6029.

Tokino, T., Murotu, T., and Matsubara, K. (1986). Purification and properties of the mini-F plasmid-encoded E protein needed for autonomous replication control of the plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 4109-4113.

Tolun, A., and Helinski, D. R. (1982). Separation of the minimal replication region of the F plasmid into a replication origin segment and a trans-acting segment. *Mol. Gen. Genet.* 186, 372-377.

Trawick, J. D., and Kline, B. C. (1985). A two-stage molecular model for control of mini-F replication. *Plasmid* 13, 59-69.

Wada, C., Akiyama, Y., Ito, K., and Yura, T. (1986). Inhibition of F plasmid replication in *htpR* mutants of *Escherichia coli* deficient in sigma 32 protein. *Mol. Gen. Genet.* 203, 208-213.

Wada, C., Imai, M. and Yura, T. (1987). Host control of plasmid replication: requirement of the  $\sigma$  factor  $\sigma^{32}$  in transcription of mini-F replication initiator gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

USA. 84, 8849-8853.

Wada, M., Kadokami, Y., and Itikawa H. (1982). Thermosensitive synthesis of DNA and RNA in *dnaJ* mutant s of *Escherichia coli* K-12. *Jpn.J.Genet.* 57, 407-413.

Wada, M., Kohno, K., Imamoto, F., and Kano, Y. (1988). Participation of *hup* gene product in *ori2*-dependent replication of fertility plasmid F. *Gene* 70, 393-397.

Watson, L. A., S. H. Phua, P. L. Berguist, and Lane, H. E. D. (1982). An Mr 29000 protein is essential for mini-F maintenance in *E. coli*. *Gene.* 19, 173-178.

Wickner, S. H. (1990). Three *Escherichia coli* heat shock proteins are required for P1 plasmid DNA replication: formation of an active complex between *E. coli* DnaJ protein and the P1 initiator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 2690-2694.

Wickner, S., Hoskins, J., and McKenney, K. (1991a). Function of DnaJ and DnaK as chaperones in origin-specific DNA binding by RepA. *Nature* 350, 165-167.

Wickner, S., Hoskins, J., and McKenney, K. (1991b). Monomerization of RepA dimers by heat shock proteins activates binding to DNA replication origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 7903-7907.

Wickner, S., Skowyra, D., Hoskins, J., and McKenney, K. (1992). DnaJ, DnaK, and GrpE heat shock proteins are required in *oriP1* DNA replication solely at the RepA monomerization step. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 10345-10349.

Wild, J., Kamath-Loeb, A., Ziegelhoffer, E., Lonetto, M., Kawasaki, Y., and Gross, C. A. (1992). Partial loss of function mutations in DnaK, the *Escherichia coli* homologue of the 70-kDa heat shock proteins, affect highly conserved amino acids implicated in ATP binding and hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 7139-7143.

Xia, G.-X., Manen, D., Goebel, T., Linder, P., Churchward, G., and Caro, L. (1991). A copy-number mutant of plasmid pSC101. *Mol. Microbiol.* 5, 631-640.

Xia, G.-X., Manen, D., Yu, Y., and Caro, L. (1993). In vivo and in vitro studies of a copy number mutation of the RepA replication protein of plasmid pSC101. *J. Bacteriol.* 175, 4165-4175.

Yang, C-C., and Nash, H. A. (1989). The interaction of E.coli IHF protein with its specific

binding sites. *Cell* 57, 869-880.

York, D., and Filutowicz, M. (1993). Autoregulation-defective mutant of the plasmid R6K-encoded  $\pi$  protein distinguishes between palindromic and nonpalindromic binding sites. *J. Biol. Chem.* 268, 21854-21861.

Zylicz, M., Yamamoto, T., McKittrick, N., Sell, S., and Georgopoulos, C. (1985). Purification and properties of the dnaJ replication protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260, 7591-7598.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、本当に多くの方々から御指導、御協力、そして激励を頂きました。指導していただいた由良隆名誉教授（現 HSP 研究所）、和田千恵子助手には、大変感謝しています。又、永田俊夫助教授、森浩禎助手（現 奈良先端大、助教授）には、セミナーなどで多くの御助言を頂きました。

東京都立大学の市川比良久教授、九州大学の堀内嵩助教授（現 基生研、教授）、C. Georgopoulos 教授、Wisconsin 大学の C. Gross 教授には菌株を、B. Kline 博士には菌株とプラスミドを、R. Eichenlaub 博士にはプラスミドを、大阪大学の松原謙一教授には抗体をそれぞれ分与していただきました。又、京大ウイルス研の重定勝哉助教授には、蛋白質の精製などの生化学実験について多くのアドバイスを頂きました。大阪大学の高木俊夫教授、八木芳子さん、東レ・リサーチセンターの絹川明夫博士、ベックマン・テクニカルセンターの小泉正博さんには蛋白質の分子量決定の際、多くの御助言と御協力を賜りました。ここに、厚くお礼申し上げます。

学会やワークショップなどでも、多くの方々から議論をしていただき、有益な御助言を頂きました。特に、金沢大学の山口和男教授、福井医科大学の犬塚学教授、奈良先端技術大学の真木寿治教授、基礎生物学研究所の堀内嵩教授、国立遺伝学研究所の堀内賢介教授の名前をあげ、感謝の意を記しておきます。

また、京大ウイルス研究所の諸先生方ならびに、大学院生の方々からも多くの御助言、御援助をしていただきました。特に、川崎泰生さん（現 阪大助手）にはいろいろとお世話になりました。又、三原真理子さん、田中喜代子さん、吉岡幸代さんには実験準備などで大変お世話になりました。心から感謝いたします。

最後に、影ながら支えてくれた家族に感謝します。

平成 6 年 1 月

石合 正道